

MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL

**AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL
DO EFEITO RADIOPROTETOR DO
SELENITO DE SÓDIO EM
GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES
DE RATOS**

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

**PIRACICABA
2005**



UNICAMP

MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL



AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DO EFEITO RADIOPROTETOR DO SELENITO DE SÓDIO EM GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES DE RATOS

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Solange Maria de Almeida

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

Prof^a. Dr^a. Márcia Maria da Fonseca Silveira

Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

Prof^a. Dr^a. Solange Aparecida Caldeira Monteiro

Prof^a. Dr^a. Solange Maria de Almeida

PIRACICABA

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

P779a Pontual, Maria Luiza dos Anjos.
Avaliação ultra-estrutural do efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas submandibulares de ratos. / Maria Luiza dos Anjos Pontual. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

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

1. Glândulas salivares. 2. Glândula submandibular.
3. Selenito de sódio. 4. Selênio. 5. Ultraestrutura. 6. Radioterapia. 7. Radiação ionizante. I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(mg/fop)

Título em inglês: Ultrastructural evaluation of the radioprotective effect of sodium selenite in rat submandibular glands

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Salivary glands; Submandibular gland; Sodium selenite; Selenium; Ultrastructure; Radiotherapy; Radiation, ionizing

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutor em Radiologia Odontológica

Banca examinadora: Frab Norberto Bóscolo; Márcia Maria da Fonseca Silveira; Pedro Duarte Novaes; Solange Aparecida Caldeira Monteiro; Solange Maria de Almeida

Data da defesa: 22/02/2005

Dedicatória

Dedico com todo amor às mulheres que são exemplos fortes na minha vida...

A minha mãe, pela sua coragem, força e determinação em educar-nos e incentivar-nos para irmos atrás dos nossos sonhos profissionais, mesmo que estes limitassem o nosso convívio. Mãe guerreira, que ausente soube como ninguém passar os valores da amizade, do amor e da justiça.

A minha avó Luiza, pessoa de grande personalidade e sabedoria, que esteve sempre presente, apoiando-me em toda a vida acadêmica.

A professora Márcia, minha referência de profissional. Nosso convívio me permitiu descobrir nela um inigualável amor à vida, à profissão e à pesquisa.

Agradecimentos

Aos Professores

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

Ao Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, que sempre manteve as portas da disciplina de Histologia abertas para a realização de nossos trabalhos na linha de radiobiologia. Apesar de bastante atarefado, sempre se mostrou solícito e disponibilizou um tempinho para o nosso trabalho....muito obrigada!

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

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

À minha Orientadora Prof^a Dr^a Solange Maria de Almeida, foi um grande prazer ser sua orientada. Além de ser uma competente orientadora, sempre se mostrou amiga, ouvindo e aconselhando-me, fosse no âmbito profissional como no pessoal. Agradeço ainda pela sua TOTAL confiança durante todo o curso para a realização de qualquer trabalho. Com o tempo de orientação, surgiram a admiração e a amizade, razão pela qual estará sempre no meu coração!

Agradecimentos

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

Aos meus eternos Mestres **Luciane e Prof. João Batista**, por terem depositado confiança desde a minha graduação e serem os primeiros a abrirem as portas para a radiologia, incentivando-me neste caminho.

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

Ao físico **José Renato de Oliveira Rocha e toda equipe do CAISM-Centro de Assistência Integral e Saúde da Mulher-Campinas**, pela disponibilidade e dedicação durante a irradiação dos animais desta pesquisa.

Aos meus colegas de curso da Radiologia, **Patrícia, Déborah, Rosana, Nilson, Sérgio, Márcia, Ana Isabel, Ricardo Matheus, Élcio, Mariliane, Ana Sílvia, Lúcio, Manzi, Tasso (in memorian), Ana Emília, Etienne, Adriana, Fábio, André, Ellen e Maria**, obrigada pela companhia e carinho.

Às amigas **Karllinha, Flávia e Juliana** pelo apoio e bem-querer incondicionais.

Ao **Flávio**, por sempre se mostrar amigo e prestativo.

Agradecimentos

Aos Funcionários da Radiologia **Raquel, Bruna e Giselda**, por nos atenderem em tudo durante o curso com muita competência. À **Roberta**, pela ajuda e apoio em todos os momentos. Foi muito boa a convivência com uma pessoa de grande coração! Continue assim!

Aos amigos **Waldeck, Fernando e Antônio**, pela força e ajuda na retirada de nossas dúvidas no dia-a-dia da clínica.

À **Eliene**, técnica da disciplina de Histologia desta instituição, pessoa de fundamental importância para o andamento desta pesquisa. Todo o seu amor pela ciência, é um exemplo de dedicação ao trabalho. O período que passamos juntas para a realização desta pesquisa foi muito prazeroso, quando nasceu uma inesquecível admiração e amizade.

A todos da Histologia, meu muito obrigada por um favor qualquer que fez diferença, por tirar uma dúvida, por conseguir um material a mais, por ter ligado o destilador, por um sorriso recíproco, por alicotar uma substância...Obrigada **Silvana, Cidinha, Gustavo, Cris, Isabel, Alexandre, Marcelo, Marcos, Luciana, Simone, Regina, Ivani, Prof^a. Darcy, Prof^a. Silvana, Prof. Sérgio, e Prof. Merzel ...OBRIGADA!!!**

Aos meus companheiros de tese **Fabício**, pela amizade, segurança e tranquilidade durante todas as fases do experimento. **Andréa**, exemplo de bom-humor, otimismo e, sobretudo, de fé.

Agradecimentos

Aos moradores do Casablanca, **Emilena, Rafael, Ronan, Eduardo e Rosena** com quem convivi estes tempos. Ressalta-se aqueles que fizeram parte da maioria dos meus finais de semana em Piracicaba, como: **Bruno**, com sua preocupação e zelo; **Rodrigo**, com seu companheirismo e simpatia e **Melissa**, primeira “piracicabana” a me acolher com todo amor e que por isso tornou-se a nossa agregada querida.

Aos meus “irmãos”

Mauro, que era para ser um dos meus melhores amigos, há muito tempo, mas tivemos que nos encontrar em Piracicaba para nos entregarmos de vez a uma grande amizade.

Jana, uma pessoa mal humorada, bem humorada e querida, muito querida! A sua sinceridade, lealdade e os seus conselhos foram de fundamental importância para a minha vida.

Karina, sinônimo de serenidade e sensatez. Obrigada pela atenção, amor e carinho de irmã que procurei e você sempre soube me atender com serenidade em todas as horas. Obrigada também por ter-me aberto as portas da sua família para me sentir um pouquinho mais “em casa”.

Agradecimentos

Aos meus familiares

Aos meus tios **Eduardo**, **Maria Joaquina** e **Marita** por sempre estarem de braços abertos esperando a minha visita.

A minha prima **Maria Eliza** e aos meus irmãos **Marina** e **Eduardo** e à minha cunhada **Raquel**, pela força e pela torcida na realização de todos os meus sonhos.

A minha irmã **Andréa** por ficar tão próxima, e ter compartilhado comigo na profissão e na especialidade de radiologia. Irmã que tive a felicidade de testemunhar seu crescimento pessoal e profissional com muito orgulho!

A **Fabiano**, companheiro de todas as horas, inclusive na participação deste trabalho. Muito obrigada pela paciência, pelo apoio e pelo respeito aos meus sonhos profissionais.

A **Deus** por ter me dado saúde e colocado pessoas maravilhosas no meu caminho neste tempo em Piracicaba.

*“Cada pessoa
é aquilo que crê;
fala do que gosta;
retém o que procura;
ensina o que aprende;
tem o que dá
e vale o que faz.”*

Emmanuel

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
5 RESULTADOS	44
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	74

RESUMO

Avaliou-se 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 subdivididos em quatro grupos experimentais: controle, irradiado, selenito de sódio e selenito de sódio/irradiado. Os animais, pertencentes aos grupos irradiado e selenito de sódio/irradiado, foram submetidos a 15 Gy de radiação gama na região de cabeça e pescoço. Nos animais correspondentes aos grupos selenito de sódio e selenito de sódio/irradiado foi administrado 0,5 mg/kg de peso de selenito de sódio por via intraperitoneal 24 horas antes da irradiação e nos grupos controle e irradiado, injetou-se solução salina. As glândulas submandibulares foram removidas após 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas da irradiação. Os resultados mostraram que a radiação causou danos, desde o primeiro tempo, nas células secretoras, sendo maior para as células serosas. Os danos intensificaram-se até o período de 12 horas, com início do processo de reparo no tempo de 24 horas, sem recuperação completa nos últimos tempos avaliados. O grupo selenito de sódio também apresentou alterações celulares nos tempos estudados, porém com menor dano em relação ao causado pela radiação. Foram observados vacuolização, lise de inclusões citoplasmáticas e alterações nucleares. O grupo selenito de sódio/irradiado apresentou maior semelhança com o grupo controle que os outros grupos tratados durante todos os tempos estudados. Foi concluído que, apesar das alterações observadas no grupo selenito de sódio, o selenito de sódio possui ação radioprotetora nas células secretoras das glândulas submandibulares.

ABSTRACT

The radioprotective effect of sodium selenite in the secretory cells of submandibular glands of rats was assessed by ultrastructural analysis. A total of 57 rats were used, which were divided into four experimental groups: control, irradiated, sodium selenite and sodium selenite/irradiated. The animals belonging to the irradiated and sodium selenite /irradiated groups were submitted to 15 Gy of gamma radiation at the head and neck. The animals in the sodium selenite and sodium selenite/irradiated groups received intraperitoneal injections of sodium selenite, 0.5mg/kg of body weight, at 24 hours before irradiation; the control and irradiated groups received injection of saline solution. The submandibular glands were removed at 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after irradiation. The results demonstrated that the radiation induced damages to the secretory cells, especially the serous cells, since the first period. The damages were increased up to the 12-hour period, with onset of the repair process at 24 hours, without complete recovery at the last periods. The sodium selenite group also presented cellular alterations in the study periods, yet with less damage compared to that caused by radiation. There was vacuolization, lysis of cytoplasmic inclusions and nuclear alterations. The sodium selenite/irradiated group was more similar to the control group than the other groups treated at all study periods. It was concluded that, despite the alterations observed in the sodium selenite group, the sodium selenite has a radioprotective action on the secretory cells of submandibular glands.

1 INTRODUÇÃO

A radiação ionizante promove danos nos tecidos, interferindo direta e indiretamente na fisiologia celular. Seu efeito indireto se dá pela indução do stress oxidativo, caracterizado pelo aumento da concentração de substâncias oxidantes, mais conhecidas como radicais livres, sendo sua produção estimulada pela presença de íons metais de transição como Ferro e Cobre (Aruoma, 1996). Os radicais livres podem atuar direta, ou indiretamente, pela formação de produtos tóxicos como o peróxido de hidrogênio. A geração excessiva de radicais livres, como os radicais superóxido e hidroxila, promove reações químicas que acarretam danos ao DNA, lipídios, proteínas e carboidratos.

Durante a radioterapia clínica, os efeitos deletérios da radiação ionizante são requeridos para a destruição de células neoplásicas malignas, mas as células normais também sofrem danos. A exposição inevitável das glândulas salivares é freqüente durante a radioterapia da região de cabeça e pescoço, o que resulta, logo após poucas frações de radiação, na diminuição da secreção de saliva, denominada de xerostomia. Esta pode persistir durante o resto da vida do paciente, contribuindo para infecções bucais, cáries e redução da gustação, mostrando-se bastante prejudicial à qualidade de vida.

O dano induzido pela radiação ionizante nas glândulas salivares tem sido reconhecido, discutido e estudado por mais de 80 anos. Ao longo destes anos, foram verificadas alterações nestas glândulas causadas pela radiação ionizante em estudos ultra-estruturais, histomorfológicos e funcionais.

Das células que constituem as glândulas salivares, as células secretoras são as mais radiosensíveis e sobretudo, as secretoras serosas (Coppes *et al.*, 2002). A glândula submandibular possui ambas células secretoras, serosas e mucosas, sendo sua exposição freqüente durante a radioterapia de cabeça e pescoço. Nos roedores, as células serosas submandibulares apresentam-se confinadas aos ductos convolutos, enquanto que as células mucosas encontram-se nas porções secretoras terminais (O'Connell *et al.*, 1999). Contudo, esta radiosensibilidade é bastante controversa, uma vez que suas células encontram-se predominantemente na fase de intérfase celular e com grau de diferenciação considerável.

Infelizmente, não há tratamento adequado para os efeitos deletérios da radiação nas glândulas salivares. Portanto, vêm-se pesquisando a administração de substâncias, denominadas radioprotetoras, que possam inibir ou atenuar estes efeitos. São diversas as substâncias estudadas que promovem radioproteção, seja pela diminuição da concentração de grânulos de secreção nas células secretoras durante a irradiação, pelo estímulo da proliferação celular posterior à radiação e por fim, pela ação antioxidante. As substâncias antioxidantes inibem a ação de radicais livres pela diminuição de sua concentração, bem como de produtos citotóxicos gerados por suas reações químicas. Dentre essas substâncias que promovem a radioproteção pela ação antioxidante, destaca-se o selenito de sódio (Tuji, 2004).

O selenito de sódio é um componente inorgânico à base de selênio. O selênio é um micronutriente essencial que passou a ser estudado a partir de 1930, quando se descobriu que a sua deficiência está associada às doenças de Keshan e Kashin-Beck. A partir de então, foram estudadas as suas propriedades antioxidantes, sendo o seu principal mecanismo de ação antioxidante determinado pela ativação da enzima glutathiona peroxidase, considerada a enzima mais eficaz

na diminuição da concentração de peróxidos de hidrogênio (Aruoma, 1996). Dentre os componentes à base de selênio, os componentes inorgânicos, como o selenito de sódio, são os antioxidantes mais eficazes (Bronzetti *et al.*, 2001).

Desta forma, vem-se comprovando a ação radioprotetora do selenito de sódio no aumento da sobrevivência de animais (Weiss *et al.*, 1992), de cultura de células (Yan & Spallholz, 1993; Rafferty *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 1999), no processo de reparação tecidual de feridas de ratos (Tuji *et al.*, 2001), no intestino de ratos (Mutlu-Turkoglu *et al.*, 2000) e por fim, nas glândulas salivares parótidas de ratos (Tuji *et al.*, 2004).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeitos da radiação ionizante nas glândulas salivares

2.1.1 Na ultra-estrutura e histomorfologia glandular

Pratt & Sodicoff (1972) e Sholley *et al.* (1974), utilizando metodologia semelhante, avaliaram as alterações ultra-estruturais em células da porção secretora terminal de glândulas parótidas de ratos irradiados. A região de cabeça e pescoço dos animais foi submetida a dose única de 16 Gy de radiação X. Nos intervalos de 1, 3, e 5 horas e de 1, 2, 3, 4, 7 e 8 dias da irradiação, as glândulas foram removidas, fixadas e incluídas em resina para a avaliação em microscópio eletrônico. Os danos nas células foram primeiramente detectados a partir das 3 horas da irradiação pela presença de alguns vacúolos contendo organelas citoplasmáticas degeneradas e/ou material nuclear. A freqüência da ocorrência destas formas de dano aumentou com o tempo e pelo segundo dia a desorganização tecidual e a atrofia dos ácinos foi máxima. No terceiro dia, vacúolos com materiais citoplasmáticos e nucleares foram encontrados menos freqüentemente. Os vacúolos por vezes continham ora materiais flocculentos, ora membranas e outros encontravam-se vazios. Uma semana depois, as células acinares passaram a apresentar maior similaridade com as células do grupo controle, porém com vacúolos vazios em quase todas elas.

Stern *et al.* (1976) estudaram as alterações ultra-estruturais nas glândulas parótidas e submandibulares de ratos Wistar submetidos a dose de 2 Gy de radiação de nêutrons no corpo todo. As glândulas foram removidas após 3,

5 horas e aos 1, 4 e 7 dias após a exposição a radiação. Foram observadas alterações citoplasmáticas nas glândulas parótidas em todos os tempos estudados. Alterações morfológicas apareceram como áreas discretas de seqüestros de organelas degeneradas, sendo mais precoces no retículo endoplasmático rugoso. A maioria das organelas degeneradas estava envolta por uma membrana, constituindo vacúolos e alguns destes, continham fragmentos nucleares. após 3 horas da irradiação, os vacúolos citoplasmáticos encontravam-se menores e constituídos principalmente de seqüestros de retículo endoplasmático e material amorfo. O dano da radiação foi mais generalizado no quarto dia após a exposição das glândulas. As áreas de degenerações citoplasmáticas decresceram numericamente no sétimo dia. Na glândula submandibular não foram encontradas alterações até o quarto dia, quando passou a apresentar o mesmo tipo e extensão das mudanças intracitoplasmáticas notadas nas glândulas parótidas. Estes achados indicaram que as porções secretoras mucosas e serosas apresentam sensibilidade diferente à radiação, devido ao intervalo de tempo requerido para as injúrias celulares se manifestarem.

Messelt & Dahl (1983) avaliaram ultra-estruturalmente os ductos estriados das glândulas submandibulares de ratos submetidos a doses únicas de 2, 7.5 e 18 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço. Após 24 horas da irradiação, os animais foram sacrificados e as glândulas fixadas e incluídas para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão. A destruição de organelas das células ductais, em especial as mitocôndrias, foi maior quando expostas a 18 Gy. Houve maior redução no número de mitocôndrias associadas as reentrâncias da membrana basal e ao aumento de núcleos pleomórficos.

Reade & Steidler (1985) estudaram os efeitos de doses de radiação X nos ductos convolutos das glândulas submandibulares de camundongos por meio da análise histomorfológica, imunohistoquímica do fator de crescimento e ultra-estrutural. A região de cabeça e pescoço dos animais correspondentes aos grupos irradiados, foi submetida a dose de 8 Gy de radiação X. As glândulas salivares dos animais foram removidas após 1 hora, 1, 2, 6, 10, 14, 22, 32, 43, 76 e 100 dias. Estas foram incluídas para estudo de coloração com hematoxilina e eosina, azul de alcian, fucsina e imunohistoquímica de fator de crescimento e microscopia eletrônica. Pelas colorações de azul de alcian e fucsina, foi observado desgranulação progressiva da primeira hora até o segundo dia após a irradiação, seguindo-se um progressivo restabelecimento e retorno aparente ao normal no septuagésimo sexto dia após a irradiação. A marcação do fator de crescimento correspondeu aos achados da desgranulação, que aumentou progressivamente, alcançando normalidade no último dia avaliado. A microscopia eletrônica revelou grânulos com membranas unidas e, no período de recuperação, pequena quantidade de grânulos secretórios, aumento da quantidade de retículo endoplasmático, com retorno da arquitetura normal da célula no septuagésimo sexto dia.

Roslindo *et al.* (1989) avaliaram histomorfologicamente glândulas parótidas de ratos jovens em diferentes intervalos de tempo após a irradiação. Foram utilizados ratos albinos Holtzman, machos divididos em dois grupos: grupo submetido a irradiação e grupo controle. Os animais pertencentes ao grupo irradiado foram anestesiados para a exposição da região de cabeça e pescoço a dose de 300 R de radiação X. O procedimento foi repetido a cada 48 horas, totalizando uma exposição de 1200 R. As glândulas parótidas foram removidas aos 3, 8, 13, 18 e 28 dias após a última exposição. As peças foram preparadas para a avaliação em microscópio de luz com as colorações hematoxilina e eosina e tricrômico de Mallory. Após 3 dias da irradiação, foram observados edema

intracelular, núcleos claros com cromatina frouxa e citoplasma pálido. No oitavo dia, as injúrias foram mais severas, caracterizando a fase mais crítica de desorganização celular, com maior número de células degeneradas e núcleos deslocados para a região basal. No vigésimo oitavo dia, a glândula parótida apresentou sinais evidentes de reparação com figuras de mitose presentes e maior número de ácinos normais. Concluiu-se que as células serosas são mais radiosensíveis das glândulas parótidas.

Stephens *et al.* (1989) compararam os efeitos das doses de 0 à 15 Gy de radiação γ Co⁶⁰, com incrementos de 2,5 por dia, “*in vivo*” e em meio de cultura enriquecido com isoproterenol de células serosas da parótida de macacos rhesus. Após 24 horas da irradiação, as células foram coradas por hematoxilina e eosina para a avaliação histomorfológica e contagem do número de núcleos que apresentavam indícios de apoptose. O aumento das doses empregadas causou maior alteração. As células mostraram as mesmas alterações em intensidade, com perda de grânulos de secreção, citoplasma eosinófilo, hiper cromasia e aberrações nucleares.

Vissink *et al.* (1991a) avaliaram o efeito da dose de 15 Gy de radiação X nas glândulas submandibulares, as quais foram removidas 4 dias antes e 3 horas, 1, 3, 6, 10 e 30 dias após a irradiação da região de cabeça e pescoço. Por microscopia de luz, nas por colorações azul de toluidina e fucsina, foram observadas apenas algumas desgranulações nos ductos convolutos nos tempos 3 horas e 1 dia da irradiação. No terceiro dia, a maior parte do tecido glandular perdeu sua integridade. Muitos núcleos apresentavam-se picnóticos e remanescentes epiteliais de células mucosas e serosas foram encontrados no tecido intersticial, houve edema, vacuolização e diminuição dos grânulos nas células serosas. Na porção mucosa, algumas células apresentaram grandes

vacúolos no seu citoplasma, núcleos picnóticos e mudanças degenerativas. No sexto dia, o tecido glandular restabeleceu parte de sua arquitetura normal, com núcleos grandes e nucléolos aumentados, sendo um indício de regeneração ativa. No décimo dia a arquitetura das glândulas salivares estava mais próxima ao grupo controle, mas ainda foram observadas poucas áreas degeneradas. Pela microscopia eletrônica, nas três horas após a irradiação, as células serosas estavam parcialmente danificadas, com acúmulos de pequenos grânulos no lúmen e presença de mitocôndrias intumescidas. Nas células mucosas, os grânulos encontravam-se com fibrilas eletrodensas. No primeiro dia, foi maior a alteração das células serosas, dos grânulos mucosos e das mitocôndrias de ambas as células secretoras. No terceiro dia da irradiação, muitas células serosas estavam desgranuladas. Havia núcleos alterados, com filamentos eletrodensos e alargamento de membrana e citoplasmas com vacúolos contendo mitocôndrias e retículos endoplasmáticos degenerados. Nas células mucosas, também, foram observadas as mesmas alterações vistas nas células serosas e aumento no número de polirribossomos livres no citoplasma originários da destruição de retículos endoplasmáticos. A regeneração também foi vista a partir do sexto dia, com maior diminuição no número de alterações e maior integridade celular no décimo dia.

2.1.2 Na função glandular

Mossman *et al.* (1981), realizando estudo em pacientes submetidos a radioterapia com radiação γ de Co^{60} , encontraram alterações nas proteínas da saliva da glândula parótida e outras na cavidade bucal como perda da gustação e cáries dentais rampantes. Foram estudados 3 grupos: grupos de pacientes submetidos a radioterapia que englobava a região de glândula parótida; grupo de pacientes submetidos a radioterapia que não envolvia a glândula parótida e o

grupo controle constituído de voluntários livres de qualquer doença crônica ou aguda. A saliva foi coletada das glândulas parótidas dos voluntários e dos pacientes previamente a radioterapia e em intervalos semanais durante a terapia. A coleta de saliva no grupo de pacientes submetidos à dose de radiação na região de glândula parótida foi possível até as 4 primeiras semanas de terapia. Já durante a primeira semana de tratamento, No grupo de pacientes irradiados envolvendo a glândula parótida, houve diminuição significativa do fluxo (50%), secreção de proteínas (60%) e maior freqüência de xerostomia, disgeusia, disfagia e anorexia.

Vissink *et al.* (1990), verificaram os efeitos nas glândulas salivares parótidas e submandibulares de ratos Wistar expostos a doses únicas de 5, 10, 15 e 20 Gy de radiação X. Foram analisados o volume, a concentração de cálcio, sódio, potássio, fosfato e amilase salivar e o período decorrido entre a administração de pilocarpina e a primeira gota de saliva. A região de cabeça e pescoço foi exposta à radiação e a coleta de saliva realizada diretamente dos ductos aos 4 dias antes e 1, 3, 6, 10 e 30 dias após a irradiação. As glândulas salivares apresentaram mudanças semelhantes na função e composição salivar. O volume e a concentração de componentes da saliva sódio e potássio, foram dose-dependentes. A partir do terceiro dia da irradiação, houve aumento do período para o início da salivação e um decréscimo do fluxo salivar. Não ocorreu nos grupos irradiados com as doses de 15 e 20 Gy, restabelecimento do tempo para o início da salivação e do fluxo salivar. A concentração de potássio aumentou e a de sódio diminuiu em todos os grupos irradiados, sendo maior para as doses 15 e 20 Gy. As mudanças na concentração de cálcio, da amilase salivar e de fosfato não foram dose-dependentes.

2.1.3 Na estrutura e função glandular

Vissink *et al.* (1991b) avaliaram o efeito da dose de 15 Gy de radiação X nas glândulas parótidas e submandibulares, por meio da análise histomorfológica e funcional. Os animais, sob efeito de anestésico, tiveram apenas a região de glândulas salivares irradiadas. Aos 4 dias antes e 3 horas, 1, 3, 6, 10 e 30 dias após a irradiação, animais de mesmo grupo foram separados para a avaliação funcional e outros para a avaliação histomorfológica. A coleta de saliva foi realizada diretamente dos ductos, após a administração de pilocarpina. As glândulas foram preparadas para avaliação em microscópio de luz pela coloração hematoxilina e eosina, azul de toluidina e fucsina básica. A partir do terceiro dia da irradiação, houve redução do fluxo salivar, diminuição da concentração de sódio e aumento da concentração de potássio. A amilase salivar decresceu durante os seis primeiros dias, seguida por um aumento no décimo dia. Além disso, houve um aumento do tempo decorrido da administração de pilocarpina e início da salivação. As mudanças morfológicas foram observadas a partir da terceira hora da irradiação, sendo máxima no terceiro dia e com recuperação parcial no décimo dia. O número de células com núcleos aberrantes foi máximo no primeiro dia seguido da irradiação e retornou ao seu nível inicial após 6 dias. Nas 3 horas e 1 dia após a irradiação, houve desgranulação das células do ducto convoluto, sendo a regranulação observada a partir do sexto dia. As mudanças morfológicas em ambas células secretoras foram maiores no terceiro dia, apresentando distensão das cisternas do retículo endoplasmático, degeneração de mitocôndrias e vacuolização do citoplasma.

O'Connell *et al.* (1999) relataram que os efeitos irreversíveis da radiação ionizante na função das glândulas salivares não são claramente explicados. Devido a este fato, investigaram possíveis alterações em glândulas submandibulares em grupos de ratos expostos a dose única de 10 Gy de radiação

gama, por meio do fluxo salivar e do estudo histológico e histomorfométrico em coloração de hematoxilina e eosina aos 8 e 13 meses da irradiação. Houve diferença significativa no fluxo salivar nos grupos de ratos aos 13 meses da irradiação, apresentando-se 40% mais baixo que o controle. As glândulas dos animais irradiados aos 8 e 13 meses mostraram-se semelhantes. Estruturas parecidas a pequenos e médios ductos foram mais comuns nos grupos irradiados. As células dos grupos irradiados encontravam-se menores e em menor quantidade, com redução do tamanho das porções secretoras terminais, ductos estriados, ductos intercalados e, principalmente, dos ductos convolutos, sendo esta diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Diante dos resultados, os autores sugeriram que o decréscimo da função da glândula submandibular irradiada é devido à diminuição do tamanho e ao número de células da porção secretora terminal.

2.2 Diferenças da radiosensibilidade nas glândulas parótidas e submandibulares

Nagler *et al.* (1993a) observaram alterações de fluxo e composição da saliva de ratos submetidos a dose de 15 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço. Foram avaliados o fluxo salivar espontâneo e o fluxo estimulado por pilocarpina, após as 0.5, 1, 4 e 24 horas após a irradiação. A coleta de saliva foi realizada diretamente dos ductos das glândulas salivares durante 30 minutos. Nos grupos irradiados não houve fluxo salivar espontâneo das glândulas submandibulares, enquanto que um dos dez ratos apresentou fluxo na glândula parótida. Em relação ao fluxo salivar estimulado pela pilocarpina, não houve diferença significativa entre o fluxo salivar das glândulas submandibulares do grupo controle e do grupo irradiado, sendo significativa apenas para o fluxo das

glândulas parótidas (42%). As concentrações dos componentes sódio, potássio e proteínas mensuradas na saliva não diferiram para a saliva das glândulas submandibulares, sendo que a saliva das glândulas parótidas apresentou concentração diminuída de sódio e aumentada de potássio.

No mesmo ano, Nagler *et al.* (1993b) também encontraram maior radiosensibilidade na função das glândulas salivares parótidas de ratos machos Wistar expostos a doses 2,5; 5; 7,5; 10 e 15 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço após 3 e 40 dias da irradiação. A redução no fluxo foi dose-dependente para ambas as glândulas, mas significativa apenas nas glândulas parótidas irradiadas pela dose de 10 Gy no segundo tempo estudado e pela dose de 15 Gy em ambos os tempos.

Henriksson *et al.* (1994) analisaram a morfologia de glândulas salivares parótidas e submandibulares irradiadas com doses fracionadas de 4, 7 ou 9 Gy, totalizando respectivamente 20, 35, ou 45 Gy nos tempos de 2, 4, 10 ou 180 dias após a última dose de radiação. Foram utilizados ratos fêmeas Wistar, que tiveram apenas um dos lados da cabeça submetido a irradiação. Os fragmentos das glândulas foram fixados, incluídos e seccionados para a avaliação em microscópio de luz com a coloração azul de toluidina. A irradiação não causou alterações morfológicas quantitativas e qualitativas nos tecidos das glândulas salivares aos 2, 4 e 10 dias após a irradiação. No entanto, após 180 dias, ocorreram alterações significativas, sendo maiores para os grupos submetidos às doses de radiação mais altas e para as glândulas parótidas. Na parótida, a diminuição de células acinares foi dose-dependente com aumento concomitante de tecido conjuntivo. Foram observados sinais de edema, sendo que as células do ducto apresentavam-se mais preservadas. Nas glândulas submandibulares houve maior decréscimo para as células dos ductos convolutos, comparando-se com as células acinares.

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

2.3 As causas da radiosensibilidade das glândulas salivares

Abok *et al.* (1984) investigaram o mecanismo de radiosensibilidade das células secretoras de glândulas submandibulares em ratos submetidos a dose de 50 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço. Os animais foram divididos em grupos controle, tratado com atrofina, tratado com fenilefrina, irradiado, pré-

tratado com atrofina 1 hora antes da irradiação e grupo pré-tratado com felinefrina 1 hora antes da irradiação. A atrofina foi administrada com a finalidade de aumentar a secreção de grânulos serosos enquanto a fenilefrina foi utilizada para inibir esta função. Seguida a irradiação, os animais foram sacrificados após 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos para a avaliação histomorfológica por microscopia de luz, quantificação celular e espectrofotométrica dos metais presentes nas células secretoras das glândulas submandibulares. Os animais do grupo irradiado e do grupo pré-tratado com atrofina, apresentaram perda de peso glandular considerável em relação aos demais grupos. A radiação causou dano nas células serosas dos ductos convolutos, sendo maior no grupo pré-tratado com atrofina. A irradiação com ou sem pré-tratamento de atrofina resultou em mudanças marcantes no número das células serosas por mm^2 , enquanto que o pré-tratamento com fenilefrina resultou em perdas menores de células serosas. Pela espectrofotometria, foi observado que os grânulos serosos são ricos em ferro, manganês e zinco. Diante dos resultados, os autores observaram ser positiva a correlação dos grânulos de secreção e a radiosensibilidade das células serosas e sugeriram que os metais presentes nos grânulos de secreção serosos potencializam o dano da radiação de suas membranas, acarretando infiltração das enzimas proteolíticas no citoplasma e conseqüente autólise e morte celular.

Norberg *et al.* (1988) estudaram o dano da radiação associado com a destruição do ducto excretor. Foram utilizados ratos Wistar divididos em 3 grupos: grupo de animais que tiveram a ligadura do ducto excretor comum das glândulas submandibulares e sublinguais do lado esquerdo; grupos de animais irradiados e grupos de animais irradiados após 1 dia da ligadura do ducto. No grupo referente aos animais que sofreram apenas ligadura nas glândulas, as glândulas do lado direito serviram como controle. Os grupos irradiados foram submetidos a três doses de 8 Gy ministradas no intervalo de 8 dias. Após 4 dias, 2 e 4 semanas as glândulas dos ratos foram removidas para avaliação em microscópio de luz com

azul de toluidina. No quarto dia, as glândulas dos grupos de animais que sofreram ligadura dos ductos, apresentaram desgranulação completa. Com os tempos estudados, houve aumento de destruição do parênquima, dilatação dos ductos intralobulares seguido por desaparecimento, hipertrofia dos ácinos, diminuição do número de células mucosas e redução no peso glandular. O grupo que sofreu ligadura e irradiação, apresentou maior perda de peso e destruição completa da glândula, com atrofia e fibrose. Os resultados levaram os autores a sugerirem que a maior degeneração nas células serosas é causada por um aumento na radiosensibilidade devido ao acúmulo dos grânulos de secreção que são ricos em metais radiopotencializadores. Já as células mucosas não são tão sensíveis quanto as células serosas.

Kohn *et al.* (1992) estudaram a função do nervo simpático em glândulas parótidas irradiadas de ratos. Somente as porções da cabeça e pescoço dos animais foram irradiadas por uma dose de 20 Gy de radiação X. Os animais foram anestesiados para a coleta de saliva diretamente do ducto da glândula parótida por 30 minutos após a administração de norepinefrina ou pilocarpina. Três dias após a irradiação, a produção de saliva induzida pela norepinefrina foi completamente bloqueada. Os ratos dos grupos irradiados quase não secretaram saliva. A saliva estimulada pela pilocarpina foi reduzida em aproximadamente 60%. A irradiação danificou a resposta das células secretoras a norepinefrina exógena, levando os autores a concluir que o dano causado na secreção deve resultar do bloqueio da resposta aos neurotransmissores simpáticos pelos nervos nas glândulas salivares.

Ahlner *et al.* (1994) analisaram histomorfologicamente pela coloração Tricrômico de Mallory, as glândulas salivares submandibulares de coelhos tratados com fármacos estimulantes ou inibidores da secreção salivar durante a

irradiação. Antes da irradiação de 15 Gy na região de cabeça e pescoço, um grupo de animais foi tratado com pilocarpina a fim de estimular a função e outro foi constituído de ratos tratados com biperiden, um inibidor da atividade salivar. A radiação causou atrofia das porções secretoras terminais, mudanças na arquitetura e redução dos grânulos. As células serosas mostraram redução pronunciada dos grânulos aos 4 meses e regeneração marcante aos 10 meses pós-irradiação. O grupo tratado com a pilocarpina, demonstrou maior dano que o grupo irradiado, enquanto que o grupo tratado com biperiden revelou menos danos. Concluiu-se que a condição funcional da glândula submandibular, durante a irradiação, possui impacto nos efeitos deletérios tardios da radiação.

Nagler *et al.* (1996) avaliaram os efeitos da restrição da ingestão de água e de alimentos na redução da função das glândulas salivares parótidas e submandibulares. Foram utilizados ratos Wistar divididos em 3 grupos: grupo controle; grupo submetido à irradiação com alimentação irrestrita e grupo com alimentação restrita. Todos os animais foram anestesiados, sendo os correspondentes ao grupo irradiado, expostos apenas na região de cabeça e pescoço a uma dose de 15 Gy de radiação X. Aos 4, 8, 11 e 14 dias da irradiação, após a anestesia e a administração de pilocarpina, os animais foram submetidos à coleta de saliva por 30 minutos. O grupo irradiado e o grupo com alimentação restrita apresentaram redução semelhante e significativa do fluxo das glândulas parótidas nos dias 4, 8 e 11. A função das glândulas submandibulares não foi alterada de forma significativa em ambos os grupos, sendo observada apenas no grupo irradiado a partir do décimo primeiro dia. Estes dados sugerem fortemente que os efeitos da radiação na função das glândulas salivares são devidos, em parte, à limitada capacidade de ingestão após a irradiação.

Nagler *et al.* (1997) avaliaram a relação dos íons Ferro e Cobre dos grânulos de secreção, no dano induzido pela radiação. Ratos *Wistar* machos foram divididos em grupo controle, grupo irradiado, grupo tratado com pilocarpina 90 minutos antes da irradiação, grupo tratado com ciclotidina 90 minutos antes da irradiação e grupo tratado, 90 minutos, com ambos os fármacos antes da irradiação. Os animais foram submetidos à dose de 15 Gy de radiação na região de cabeça e pescoço. Os efeitos dos fármacos nas glândulas salivares parótidas e submandibulares foram examinados 90 minutos após a administração destes por microscopia eletrônica de transmissão. Apenas a glândula parótida apresentou desgranulação completa quando tratada com ciclotidina. Após 2 meses da irradiação, foram realizadas: a coleta de saliva para análise da função e a remoção das glândulas com a finalidade de se mensurar as concentrações de ferro e cobre. O grupo irradiado e o grupo pré-tratado com pilocarpina apresentaram perda marcante da função em ambas glândulas salivares, enquanto que o grupo tratado com ciclotidina demonstrou proteção significativa apenas para as glândulas parótidas. Observou-se presença dos íons ferro e cobre em ambas as glândulas. Foi concluído que a correlação entre a desgranulação, mobilização dos íons metálicos e a proteção da função das glândulas são indícios do envolvimento dos íons metálicos na promoção de reações dos radicais livres, os quais participam do processo de dano tecidual.

Baseando-se também na radiosensibilidade das glândulas salivares promovida pelos grânulos de secreção, Coppes *et al.* (1997) avaliaram a desgranulação prévia à irradiação de 15 Gy nas células secretoras das glândulas salivares de ratos. Os animais foram subdivididos em grupo controle, grupo irradiado, grupo tratado com isoproterenol 90 minutos antes da irradiação, grupo tratado com fenilefrina 60 minutos previamente à irradiação, grupo tratado com metacolina 120 minutos antes da irradiação e grupos tratados previamente à irradiação com dois desses três fármacos. Foi avaliada a função das glândulas

salivares 4 dias antes e aos 1, 3, 6, 10 e 30 dias após a irradiação. As glândulas parótidas apresentaram desgranulação apenas quando administrado isoproterenol. As glândulas submandibulares mostraram desgranulação das células serosas após o pré-tratamento com fenilefrina e metacolina, enquanto que as células mucosas apresentaram-se desgranuladas quando foi utilizado o isoproterenol ou a associação metacolina e fenilefrina. As associações restantes com o isoproterenol não causaram desgranulação. A ação da radiação resultou no aumento do tempo decorrido da administração de pilocarpina e o início da salivação, decréscimo do fluxo das glândulas salivares e redução da amilase salivar. Durante os últimos tempos estudados, o início da salivação e o fluxo foram mais próximos ao grupo controle para os grupos pré-tratados com fenilefrina, isoproterenol e a associação metacolina e fenilefrina. Os autores concluíram que a fenilefrina e a associação desta com a metacolina protegem ambas as glândulas dos danos da radiação ionizante, sendo este efeito relacionado à proliferação e diferenciação, uma vez que o pré-tratamento com a associação metacolina e fenilefrina e estas com o isoproterenol, não causou desgranulação.

Nagler & Laufer (1998) estudaram o envolvimento dos grânulos de secreção das glândulas salivares parótidas e submandibulares de ratos Wistar machos no dano induzido pela dose de 15 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço. Os animais foram divididos em grupo controle, grupo irradiado, grupo tratado com pilocarpina 1 hora previamente a irradiação e grupo tratado com ciclotidina 1 hora antes da irradiação. Seguidos 4 e 60 dias da irradiação, foram realizadas as análises de fluxo salivar. Somente a glândula parótida no segundo tempo avaliado, apresentou função equivalente ao grupo controle quando pré-tratada com pilocarpina. A eficácia da desgranulação prévia na proteção da glândula parótida foi explicada por estas serem constituídas por cerca de 80% de células serosas, as quais contêm numerosos grânulos de secreção serosos, sendo esta proporção pequena na glândula submandibular. Os resultados levaram

os autores a enfatizarem a importância do envolvimento dos grânulos de secreção nos efeitos precoces e tardios da radiação ionizante e que a propagação de radicais livres pode resultar em danos a diferentes constituintes da célula como o DNA e membranas.

2.4 Radioproteção nas glândulas salivares

Furuno *et al.* (1974) estudaram os efeitos da administração do isoproterenol, um β -adrenérgico, na proliferação celular e síntese de DNA de glândulas salivares de ratos Wistar machos, diante da exposição a doses de 0.5 a 4000 R de radiação X. Os animais foram divididos em grupos controle, irradiado, tratado com isoproterenol e irradiado e tratado com isoproterenol. O isoproterenol foi administrado por 3 injeções de 1 $\mu\text{mol/g}$ de peso corpóreo, sendo a primeira administrada 30 minutos depois da irradiação e as restantes 48 horas após cada dose. Observou-se aumento da proliferação celular no grupo apenas tratado por isoproterenol, sendo maior decorridos 24 horas da administração. No grupo apenas irradiado, ocorreu significativo decréscimo dose-dependente de células e da síntese de DNA, enquanto que no grupo irradiado e tratado com isoproterenol houve aumento da síntese e proliferação celular, com exceção para os animais irradiados com doses a partir de 2000 R.

Sodicoff *et al.* (1978) avaliaram o efeito radioprotetor do WR-2721 na região de glândula parótida direita de ratos fêmeas albinos Wistar irradiados. A substância WR-2721 foi administrada 15 a 20 minutos antes da exposição das glândulas parótidas dos animais às doses de 1000, 1600, 2000, 2400, 3000, 3400, 4000, 4800, 5000 e 6000 R de radiação X. Foram realizadas análises da concentração de amilase salivar das glândulas dos lados irradiado e não irradiado

após 30, 60 e 90 dias da exposição. Os resultados demonstraram a atividade radioprotetora contra os efeitos crônicos da radiação, levando os autores a sugerirem a utilização do WR-2721 na redução da xerostomia e nas suas complicações de pacientes submetidos à radioterapia como tratamento de neoplasias que envolve a região bucal.

Existe uma variedade de métodos radioterapêuticos para tumores sólidos. Uma estratégia baseia-se na utilização de drogas que mimetizam oxigênio para tornar um tumor hipóxico mais sensível à radiação X ou γ . Diante da conhecida atividade radioprotetora da substância WR-2721 em tecidos normais e da ação radiosensibilizante da substância Ro-07-0582, Sodicoff *et al.* (1979) avaliaram a associação desses dois agentes em glândulas salivares irradiadas de ratos fêmeas albinos Wistar. Os animais foram divididos em: grupo controle; grupo protegido com 400 mg/kg de peso de WR-2721; grupo tratado com 200 mg/kg de peso de Ro-07-0582 e grupo tratado com ambos os fármacos. A radiação foi localizada apenas na região de glândula parótida direita. As doses de radiação administradas foram 1000, 1600, 2000, 2400, 3000, 3400, 4000, 4800, 5000 e 6000 R de radiação X. Foram analisados os pesos das glândulas nos 10 primeiros dias após a irradiação. Verificou-se maior perda de peso nos animais irradiados com doses maiores, sendo a menor perda de peso nos grupos tratados com WR-2721. Já os grupos controle e Ro-07-0582 não apresentaram diferença. A combinação do WR-2721 e do Ro-07-0582 não reduz a proteção do WR-2721 sozinho.

A estimulação dos β -receptores resulta no aumento da quantidade e ação do AMP cíclico, o qual possui ação radioprotetora. Com a finalidade de verificar a ação radioprotetora por meio da estimulação dos β -receptores pelas substâncias WR-2721 e isoproterenol, Sodicoff & Conger (1983a) utilizaram o

propranolol, um antagonista dos β -receptores, associado a essas drogas. As drogas foram administradas 20 minutos antes da irradiação das glândulas parótidas do lado direito. Todos os grupos foram subdivididos de acordo com a dose de radiação empregada: 1000, 1600, 2000, 2400, 3000, 3400, 4000, 4800, 5000 e 6000 R de radiação X. Foram analisados os pesos das glândulas nos 10 primeiros dias após a irradiação. Verificou-se maior perda de peso nos animais irradiados com doses maiores. Todos os grupos apresentaram maior peso glandular que o grupo apenas irradiado, sendo o peso maior no grupo WR-2721 associado com isoproterenol. Em relação ao grupo tratado com isoproterenol associado ao propranolol, o peso glandular foi similar ao grupo tratado apenas com propranolol. Diante dos resultados, os autores concluíram que o isoproterenol, ao contrário do WR-2721, age como radioprotetor pela via β -receptor. Os autores concluíram também que o propranolol age como radioprotetor, sendo o seu mecanismo de ação desconhecido.

Empregando as mesmas doses de radiação do estudo anterior, Sodicoff & Conger (1983b) avaliaram o efeito radioprotetor do AMP cíclico em glândulas parótidas de ratos albinos fêmeas Wistar. Os animais foram submetidos ao tratamento com 30 mg/kg de peso de AMP cíclico aos 20, 60, 90, e 120 minutos anteriores e aos 30 minutos posteriores da irradiação. Foi analisado o peso glandular nos 7 primeiros dias após a irradiação, o qual diminuiu com o aumento da dose de radiação, sendo essa diminuição menor para o grupo previamente tratado com AMP cíclico. A radioproteção dada pela administração prévia do AMP cíclico à irradiação não diferiu nos tempos estudados mas, em relação ao grupo tratado após a irradiação este não apresentou sinais de radioproteção. Esta última observação levou os autores a concluírem que o AMP cíclico deve estar presente antes da irradiação, por ser um radioprotetor e não um simples facilitador de reparo do dano da radiação ionizante.

Peter *et al.* (1994) estudaram o efeito protetor do isoproterenol, um agente desgranulante das células acinares, nas glândulas salivares parótidas e submandibulares, por meio da presença de aberrações nucleares e lises causadas pela exposição a 15 Gy de radiação X. Foram utilizados ratos machos albinos Wistar, que foram subdivididos em grupo controle, grupo tratado com 5 mg/kg de peso de isoproterenol e grupo irradiado 90 minutos após o pré-tratamento com isoproterenol. As glândulas foram removidas nos tempos 0, 1, 2, 3, 6, 12 horas e 1, 3, 6 e 10 dias após a irradiação para análise histomorfológica pela coloração hematoxilina e eosina. A radiação causou as mesmas seqüências de mudanças morfológicas em ambas as glândulas: desgranulação das células serosas, indução de aberrações nucleares, lise dos grânulos de secreção e recuperação parcial com vacúolos no último tempo estudado. A desgranulação das células acinares pelo isoproterenol não protegeu o tecido contra as mudanças iniciais induzidas pela radiação, mas acelerou a reparação da integridade tecidual apenas na glândula parótida. Diante dos resultados, os autores concluíram que a radiosensibilidade dos compartimentos epiteliais não está relacionada diretamente à presença de grânulos de secreção e que o restabelecimento mais rápido das células no grupo pré-tratado com isoproterenol pode ser devido à capacidade desta droga de induzir a estimulação da proliferação celular nas glândulas parótidas.

Bohuslavizki *et al.* (1999) afirmaram que no tratamento do câncer da tireóide, pela administração de iodo radiativo, quantidades significantes também são acumuladas nas glândulas salivares, podendo levar a xerostomia devido à emissão de radiação β . Pela capacidade radioprotetora da amifostina ser reconhecida e pela sua maior afinidade pelas glândulas salivares, estes autores avaliaram seu efeito radioprotetor em glândulas salivares. Foram utilizados ratos albinos Wistar, dos quais 5 pertenceram ao grupo controle e 10 perfizeram o grupo tratado com 200 mg/kg de peso de amifostina previamente a terapia com iodo

radioativo (2 GBq ^{131}I). Foram quantificadas a função do parênquima das glândulas parótidas, submandibulares e tireóides, por meio da realização de cintilografia antes e num intervalo de 4 semanas durante 24 semanas após a aplicação do iodo radioativo. Ao término das 24 semanas, foram removidas as glândulas salivares para estudo histomorfológico pela coloração de hematoxilina e eosina. Em ambas as análises, constatou-se o efeito radioprotetor da amifostina nas glândulas salivares. Houve maior captação do tecnécio no grupo tratado com amifostina, ressaltando-se que isto não ocorreu nas glândulas tireóides. Resultados similares foram vistos durante avaliação histomorfológica, havendo maior degeneração nos animais sem o pré-tratamento quando comparado com o grupo tratado com a amifostina. Os autores concluíram que o dano no parênquima das glândulas salivares induzido pelo iodo radioativo pode ser significativamente reduzido pela amifostina.

Roesink *et al.* (1999) avaliaram o efeito protetor da administração de pilocarpina anteriormente à irradiação das glândulas parótidas de ratos. Grupos de ratos machos Wistar foram submetidos a dose intraperitoneal de 4 mg/kg de pilocarpina uma hora antes da irradiação. Sob anestesia, os animais tiveram apenas as glândulas parótidas do lado direito submetidas as doses únicas de 10, 15, 20 e 30 Gy de radiação X. Foram coletadas as salivas 4 dias antes e aos terceiro, sétimo e trigésimo dias da irradiação. Após a administração intraperitoneal de pilocarpina, foram coletadas amostras de saliva de ambas as glândulas parótidas. A radiação causou um decréscimo rápido, dose-dependente na função das glândulas, permanecendo no último dia avaliado. Não foram observados efeitos significantes na função das glândulas não irradiadas. Observou-se que a partir do sétimo dia, o pré-tratamento com pilocarpina resultou em menor dano da função das glândulas, mas não protegeu as glândulas irradiadas com uma dose de 30 Gy.

Nagler *et al.* (2000) avaliaram o efeito radioprotetor das enzimas antioxidantes superóxido dismutase Manganês e superóxido dismutase cobre/zinco contra os danos causados pela dose de 15 Gy de radiação γ na região de cabeça e pescoço de ratos machos Wistar. Os animais compuseram 4 grupos: controle; irradiado; irradiado e tratado com 50 mg/kg de peso de superóxido dismutase manganês 90 minutos antes da irradiação; irradiado e tratado com 100 mg/kg de peso de superóxido dismutase cobre/zinco 30 minutos antes e após a irradiação. Foram mensuradas diariamente, durante as 2 primeiras semanas, o peso corpóreo e a captação de comida. Foi realizada contagem das células sangüíneas aos sexto e décimo segundo dias após a irradiação e a função das glândulas parótidas e submandibulares foi mensurada 2 meses após a irradiação. As enzimas superóxido dismutase impediram a diminuição de células sangüíneas brancas, enquanto que apenas a enzima superóxido dismutase manganês protegeu parcialmente a função das glândulas parótidas. Estes resultados sugerem que a enzima superóxido dismutase impede parcialmente a diminuição das células sangüíneas e as injúrias na região de cabeça e pescoço causadas pela radiação ionizante.

Coppes *et al.* (2001) avaliaram o efeito radioprotetor da felinefrina, isoproterenol, pilocarpina e metacolina nas glândulas parótidas de ratos Wistar machos, submetidos a dose de 15 Gy de radiação X. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle, irradiado, tratado 60 minutos antes da irradiação com isoproterenol, tratado com fenilefrina 60 minutos antes da irradiação, tratado com pilocarpina 60 minutos anterior a irradiação, tratado com metacolina 60 minutos antes da irradiação e tratados com as associações de duas das quatro substâncias estudadas. A função e a análise histomorfológica das glândulas salivares foram realizadas nos dias 1, 3, 7, 10, 30, 60, 120, 180 e 240 seguidos a irradiação. A radiação na fase aguda (10 primeiros dias) causou um rápido declínio no fluxo, sem mudanças na secreção de amilase salivar e número de

células acinares. Na fase inicial (10-60 dias) ocorreu decréscimo de secreção de amilase salivar e das células acinares, continuando similar na fase intermediária (60-120 dias). Na fase tardia (120-240 dias) a função tornou-se bastante comprometida, com maior desorganização tecidual, apesar de um aumento nas quantidade de células acinares. Todos os fármacos estudados promoveram efeito radioprotetor nas fases aguda e inicial, mas com perda de efeito protetor na fase tardia, com exceção para a associação da metacolina e felinefrina. Os resultados levaram os autores a sugerirem a aplicação clínica da associação da metacolina e felinefrina como método radioprotetor na radioterapia de cabeça e pescoço.

2.5 Selenito de sódio

Nordman *et al.* (1976) relataram que a captação do selenito de Sódio por células neoplásicas malignas tem sido objeto de inúmeras investigações pela sua boa especificidade, suposta pela presença dos grupos sulfidrilas nas proteínas destas células, pois o selênio é ligado a proteínas por meio da união dos grupos de enxofre. Os tumores malignos acumulam selenito em cerca de 86% dos casos enquanto que as lesões benignas acumulam apenas em 23% dos casos. Nordman *et al.* (1976) analisaram a captação do selenito de sódio no tecido “*in vitro*” e “*in vivo*”. O estudo “*in vitro*” foi realizado por meio de espécimes de fígado oriundos de ratos, expostos a uma dose de 20 Gy fracionada em 4 vezes de 5 Gy na região do fígado e em seguida incubados com selenito de sódio de 1 a 3 horas. Em outros espécimes, a administração do selenito, foi realizada anteriormente a remoção do fígado dos animais, para em seguida, removê-los e expô-los. A concentração de selenito no grupo irradiado correspondeu a 89% do encontrado no grupo controle. Quando foi administrado o selenito por via intravenosa ainda no animal antes da remoção do fígado, houve uma diminuição de 3%. Nos

experimentos “*in vivo*”, ratos com tumores no abdômen foram irradiados por uma dose de 17,5 Gy. Depois de 24 horas da última dose de radiação, foi administrado selenito de sódio e 1 hora após, sacrificados para análise da quantidade de selenito no fluido peritoneal, sendo também analisado o acúmulo do selenito nos tumores. A análise do fluido peritoneal dos animais irradiados mostrou 71% de selenito em relação ao grupo não irradiado. Nos tumores, a concentração no grupo irradiado foi de 62% do grupo não irradiado. Estes resultados sugerem mudanças no metabolismo das proteínas após a irradiação, que promove decomposição dos grupos sulfidrilas.

Weitberg *et al.* (1985), investigaram os efeitos das enzimas antioxidantes glutatona e catalase, bem como do selenito de sódio na inibição da permutação de cromátides irmãs. Cultura de células ovarianas de hamster chineses foram incubadas com enzimas superóxido dismutase ou catalase e com químicos, dentre os quais o selenito de sódio. Em seguida, foi adicionado leucócitos para a promoção das espécies oxigênio reativas. Observou-se diminuição da permutação das cromátides nas culturas adicionadas às enzimas antioxidantes e tratadas com baixas doses de selenito de sódio. No entanto, maiores concentrações de selenito de sódio causaram aumento no número de cromátides irmãs permutadas. Os autores explicaram que, embora o selenito de sódio possua propriedades catalisadoras da glutatona peroxidase, o mesmo pode induzir a permutação de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas em certas doses.

Yan & Spallholz (1993) relataram que o selênio é um nutriente essencial com comprovada ação carcinostática “*in vitro*” e “*in vivo*”, mas em determinada quantidade possui toxicidade. Pesquisas têm demonstrado que a glutatona participa da citotoxicidade induzida pelo selenito e sugerem conseqüente produção

de radicais livres. O aumento na peroxidação lipídica pelo selenito tem sido reportado “*in vivo*” e “*in vitro*”. Diante dessas observações, os mesmos autores realizaram estudo “*in vitro*” com a finalidade de verificar a capacidade dos componentes de selênio, dentre eles o selenito de sódio, de gerar superóxidos pela oxidação da glutathione e outros tióis, na ausência e presença de células humanas de tumores de mama. A produção de radicais livres foi mensurada pela quimioluminescência. Houve grande produção de peróxido de hidrogênio e de radicais superóxidos pela oxidação do selenito com a glutathione nas células tumorais mamárias. Já o acréscimo das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase diminuiu. Os autores observaram que o excesso da dieta de componentes de selênio, promove a oxidação da glutathione e de outros tióis para produzir radicais superóxido e peróxido de hidrogênio.

Lu *et al.* (1994) estudaram o efeito do selenito nas Unidades Formadoras de Colônias (UFC), quebras de DNA e apoptose em culturas de células leucêmicas de ratos. Culturas de células leucêmicas do grupo L1210 foram submetidas a suplementação de selenito de sódio com concentrações que variavam de 0 a 20 μM e incubadas de 7 a 10 dias. As alterações causadas pelo selenito de sódio aumentaram com o tempo e com a dose administrada. Houve redução das UFC e aumento da quebra de um filamento de DNA, seguido da ativação de endonucleases que produzem a quebra de dois filamentos de DNA até a indução da morte celular por apoptose. Os resultados levaram os autores a proporem uma hipótese acerca da morte celular induzida pelo selenito de sódio: primeiramente ocorre a quebra de um filamento de DNA que ativa a endonuclease, a qual promove a dupla quebra do filamento de DNA com subsequente apoptose.

Segundo Gøenback *et al.* (1995), o selênio é um micronutriente essencial e um constituinte do sítio ativo da enzima glutathiona peroxidase, mas também pode causar toxicidade. Dentre os danos da intoxicação nos animais jovens, destaca-se o retardo no crescimento. Assim, os autores estudaram a influência do selenito de sódio no crescimento, nos fatores de crescimento de insulina e de proteínas em ratos Wistar. Os animais foram divididos em 3 grupos: o grupo A, tratado com selenito de sódio diluído em água “*ad libidum*” por duas vezes na semana, com dose equivalente a 3.3 mg/l de selenito de sódio; o grupo B correspondeu ao grupo controle e o grupo C, recebeu a metade da dose de selenito dada no grupo A. Foram monitorados a ingestão de alimentos e o peso, e mensurados o comprimento do rabo e da tíbia após a dissecação do animal para a obtenção dos rins e fígado. Os fatores de crescimento foram determinados no décimo quarto e no trigésimo quinto dias. O grupo de animais tratados com selênio apresentaram perda significativa de peso, comparado ao grupo B no nono dia e ao grupo C no décimo quarto dia. O comprimento da tíbia no grupo A foi significativamente menor em relação ao grupo C e fortemente significante em relação ao grupo B. Houve redução dos fatores de crescimento no final do estudo do grupo A em relação aos grupos B e C. Os autores concluíram que o selenito de sódio causa retardo de crescimento e redução do nível de fatores de crescimento.

Bezlepkin *et al.* (1996) estudaram os efeitos de uma mistura de antioxidantes, composta por beta-caroteno, α -tocoferol, ácido ascórbico, selenito de sódio e glucanato, correspondendo a 35 g/kg da dieta, na sobrevivência de ratos iniciando a partir de 2, 9, 16 e 23 meses de idade. Os ratos foram pesados uma vez por mês e a mortalidade calculada no final de cada mês. Quanto ao peso, não houve diferença entre os grupos estudados, mas a mortalidade dos animais que receberam a suplementação da mistura iniciada aos 2 e 9 meses de idade, mostrou-se significativamente menor em comparação ao grupo controle. Já para os ratos que receberam a suplementação a partir da idade de 16 e 23 meses, a

mortalidade foi semelhante ao grupo controle. Foi concluído que a ação dos antioxidantes na defesa dos genes depende da idade da administração e que os antioxidantes não enzimáticos possuem importante papel na regeneração da defesa dos genes.

Wilson *et al.* (1997) estudaram a farmacocinética do selenito em patos de um lago rico em selenito de sódio, os quais apresentavam efeitos teratogênicos ao nascimento como deformidade dos bicos, anomalias oftalmológicas e distúrbios de desenvolvimento em órgãos, como o coração. Foram encontrados acúmulos de selênio no pâncreas, no pulmão, no baço, no fígado, no cérebro, no plasma sanguíneo e em especial no ovário, que apresentou o dobro de concentração em relação aos demais órgãos estudados. Estes resultados levaram os autores a sugerirem que o acúmulo de selênio, em níveis tóxicos, pode promover efeitos teratogênicos no embrião em desenvolvimento.

Bronzetti *et al.* (2001) estudaram os efeitos protetores do selenito de sódio no dano oxidativo do citoplasma de fungos. Foram estudados grupos de cultura de células de *Saccharomyces cerevisiae* constituindo: grupo controle, grupo de culturas nas quais foram adicionadas peróxido de hidrogênio; grupos tratados com diferentes doses de selenito de sódio; grupos nos quais foram adicionados peróxido de hidrogênio e as diferentes doses de selenito de sódio. Foi determinada a atividade das enzimas glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase do citoplasma nas diferentes concentrações de selenito. Dose de 10 μM de selenito de sódio reduziu a porcentagem de sobrevivência em 70%. Na cultura em que foi adicionada 400nM de peróxido de hidrogênio, houve redução de sobrevivência para 61%. Em culturas onde houve acréscimo de selenito de 0.01 e 0.1 μM , houve aumento da sobrevivência para 100%. O selenito de sódio induziu aumento da atividade das três enzimas. Os resultados levaram os autores a

sugerirem que o selenito de sódio possui efeitos antioxidantes gerais envolvendo diferentes fases no processo de desoxidação.

Dellibasi *et al.* (2002), estudaram os efeitos do selenito de sódio em mandíbulas de ratos diabéticos. Foram utilizados ratos Wistar divididos em grupo controle, grupo tratado com selênio, grupo diabético e grupo diabético tratado com selênio. Nos grupos tratados com selenito de sódio, foram administrados por via intraperitoneal 5 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corpóreo por dia, durante 4 semanas. Na quinta semana, todos os animais foram sacrificados e removidas as mandíbulas. As porções esquerdas foram preparadas para avaliação densitométrica e a porção direita para estudo histomorfológico pela coloração de hematoxilina e eosina. A análise histomorfológica concordou com a densitométrica. Os animais diabéticos tratados com selênio apresentaram densidade e histomorfologia próxima do grupo controle, enquanto que no grupo de animais tratados com selênio, a densidade mandibular foi menor e as alterações com destruição do trabeculado ósseo, desorganização de fibras colágenas e aumento de atividade osteoclástica assemelharam-se às encontradas no grupo de ratos diabéticos. Os resultados levaram aos autores a sugerirem que o selenito de sódio promove efeitos benéficos em ratos diabéticos, mas as injúrias nos animais tratados com selênio, demonstram a necessidade de mais estudos sobre os mecanismos dos efeitos do selênio em organismos.

Saito *et al.* (2003) analisaram o efeito da carência de selênio em culturas de células leucêmicas humanas num período de 72 horas. Foi observada diminuição do número de células a partir do período de 24 horas, com perda de 95% após 60 horas. A atividade das enzimas glutathione peroxidase e thioredoxina reductase foi reduzida a 36 e 39 % respectivamente após 24 horas, sendo a atividade insignificante no último tempo estudado. A morte das células foi

precedida da grande concentração de espécies oxigênio reativas, principalmente hidroperóxidos lipídicos. Os autores concluíram que a deficiência de selênio causa diminuição da atividade da glutathione peroxidase e da thioredoxina reductase e aumento da peroxidação das membranas e morte celular.

2.6 O selenito de sódio como radioprotetor

Weiss *et al.* (1992), pesquisaram a radioproteção do selenito de sódio em ratos Wistar submetidos a dose de 6 Gy de radiação γ Co^{60} no corpo todo. Os animais foram divididos em grupos, conforme os tempos de administração da dose de 0,8 mg/kg de peso corpóreo de selenito de sódio: 24 horas e 1 hora antes e 15 minutos após a irradiação. Houve redução da mortalidade em todos os tempos estudados após 30 dias, com maior eficácia para os grupos de animais tratados 24 horas antes da irradiação.

Rafferty *et al.* (1998) afirmaram que a glutathione peroxidase é uma selenoproteína que pode mediar o efeito protetor do selênio, por meio da desoxidação dos peróxidos de hidrogênio, hidroperóxidos lipídicos e hidroperóxidos fosfolipídicos que são produzidos pela radiação. Desta forma, os mesmo autores avaliaram o efeito radioprotetor do selenito de sódio e da seleniomietionina em culturas de células de queratinócitos submetidas a radiação ultravioleta. Culturas de células foram suplementadas com diferentes doses de 1 nM a 10 μ M de selenito de sódio ou de seleniomietionina 24 horas antes ou logo após a dose de 480 a 1200 J/m² de radiação ultravioleta. O selenito de sódio, sem a administração da dose de radiação ultravioleta, causou toxicidade a partir da concentração de 1 μ M. A dose de radiação ultravioleta de 960 J/ m² produziu 80%

de morte celular após 48 horas da exposição. A administração dos derivados de selênio reduziu a morte celular, sendo a suplementação 24 horas antes da irradiação mais eficiente. O selenito de sódio mostrou-se eficaz em todas as doses estudadas, principalmente na dose de 10 nM, reduzindo a mortalidade pra cerca de 21%. Já a selenometionina foi menos potente, sendo necessário doses acima de 10 nM para proporcionar radioproteção semelhante. Os resultados levaram os autores a afirmarem que as formas inorgânicas do selênio, como o selenito de sódio são radioprotetores mais eficazes que as formas orgânicas como a selenometionina.

Stewart *et al.* (1999) avaliaram os componentes a base de selênio, dentre eles o selenito de sódio, sob diversas concentrações, na indução do stress oxidativo e apoptose em cultura das células queratinócitos de ratos. Foram mensurados os níveis de citotoxicidade, de glutathione redutase, da atividade da glutathione peroxidase e das lesões oxidativas no DNA 24 horas após a suplementação e a exposição aos raios ultravioletas. A adição do selenito de sódio causou redução dose-dependente da quantidade de glutathione redutase e aumento da atividade da glutathione peroxidase. As lesões oxidativas no DNA e apoptose foram maiores para as culturas de células suplementadas com selenito de sódio. Entretanto, após a exposição aos raios ultravioletas de culturas das células, a suplementação do selenito de sódio reduziu a freqüência da oxidação de DNA em relação às células que não receberam o suplemento. Estes resultados levaram os autores a afirmarem a dicotomia do selênio, pelo seu poder de inibir e produzir danos. Em concentrações tóxicas, as injúrias são causadas pela produção de superóxidos por meio da redução do ânion seleniopersulfito (GSSe^-), originário da selêniodiglutationa. Em relação a inibição do danos, esta se deve a sua associação à glutathione peroxidase, protegendo as células contra o stress oxidativo causado pela radiação ultravioleta.

Mutlu-Turkoglu *et al.* (2000) estudaram os efeitos protetores da administração do selenito de sódio, vitamina E e ambos, anteriormente a exposição do intestino delgado de ratos Wistar machos a dose de 10 Gy de radiação X. Após três dias da irradiação, uma porção do intestino delgado foi removida imediatamente ao sacrifício para avaliação histomorfológica em microscópio de luz pela coloração hematoxilina e eosina e para determinação dos níveis de glutathione, da peroxidação lipídica, das atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. A peroxidação lipídica foi mensurada pela presença da substância ácido-reativa ao tiobarbitúrico. O pré-tratamento previniu a redução das camadas, do número e do tamanho das vilosidades intestinais causada pela irradiação; bem como o aumento do nível de substâncias ácido-reativas ao tiobarbitúrico, o decréscimo da concentração do antioxidante glutathione e a diminuição das atividades das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase, com exceção desta última enzima para o grupo tratado apenas com a vitamina E. Estes resultados levaram os autores a afirmarem que a administração dessas substâncias antes da irradiação, possui efeitos protetores contra as alterações intestinais induzidas pela radiação.

Tuji, em 2001, avaliou o efeito do selenito de sódio no processo de reparação tecidual em feridas de ratos irradiados por 6 Gy de radiação de elétrons. Os animais foram divididos em: grupo controle, grupo selênio, grupo irradiado e grupo selênio irradiado. Em todos os grupos foi produzida uma ferida na região dorsal dos animais. O grupo selênio e o grupo selênio/irradiado foram tratados por 0,5 mg/kg de peso de selenito de sódio via intraperitoneal 24 horas antes da irradiação. Apenas as feridas dos animais do grupo irradiado e selênio/irradiado foram irradiadas após 3 dias da produção da ferida. Aos 4, 7, 13 e 21 dias após o ferimento, as feridas foram removidas para avaliação histomorfológica por hematoxilina e eosina, tricrômico de Mallory e fucsina. O selenito de sódio atuou como radioprotetor, uma vez que o processo de reparo

nos animais do grupo selênio/irradiado e do grupo selênio deu-se de forma semelhante ao grupo controle, constituído por animais não irradiados.

Segundo Rafferty *et al.* (2003), a radiação ultravioleta pode causar morte por necrose e apoptose celular. A necrose decorre de uma injúria aguda, sendo caracterizada por edema e lise celular e a apoptose possui morfologia distinta com as células, apresentando núcleos e citoplasmas diminuídos, núcleos com cromatina condensada e fragmentos celulares envoltos por membranas. Os mesmos autores estudaram a ação do selenito de sódio em culturas de queratinócitos expostas a radiação ultravioleta, avaliando a presença de apoptose. Células de queratinócitos foram incubadas com doses de 1 nM a 1 µM de selenito de sódio 24 horas antes da exposição a 600 j/m² de radiação ultravioleta. O selenito de sódio diminuiu a apoptose nas concentrações de 10 nM a 1 µM, sendo maior o efeito para as concentrações de 100 a 200nM, que preveniram completamente a apoptose induzida pela radiação ultravioleta.

Tuji (2004) avaliou o efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas parótidas de ratos, por meio da análise ultra-estrutural das células acinares. Foram utilizados ratos Wistar subdivididos em quatro grupos experimentais: controle, irradiado, selênio e selênio/irradiado. Os animais pertencentes aos grupos irradiado e selênio/irradiado foram submetidos a 15 Gy de radiação γ na região de cabeça e pescoço. Nos animais correspondentes aos grupos selênio e selênio/irradiado foi administrado 0,5 mg/kg de peso de selenito de sódio por via intraperitoneal 24 horas antes da irradiação. As glândulas parótidas foram removidas após 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas da irradiação. A radiação causou alterações celulares a partir de 4 horas. Foram observados vacúolos, alterações nucleares, destruição dos grânulos de secreção e de organelas. O grupo selênio apresentou alterações celulares a partir da oitava hora, porém com menor dano em relação àquele causado pela radiação. O grupo

selênio/irradiado apresentou menor intensidade nas alterações com início do processo de reparo nas 12 horas após a irradiação e melhor organização com 48 e 72 horas, sem reparação completa neste último tempo avaliado. Apesar das alterações vistas no grupo apenas tratado com selenito de sódio, sua utilização como radioprotetor de glândulas parótidas é válida, por apresentar relação risco-benefício favorável.

3 PROPOSIÇÃO

Propõe-se nesta pesquisa, através da análise ultra-estrutural, avaliar o efeito radioprotetor do selenito de sódio em danos causados pela radiação gama nas células secretoras de glândulas submandibulares de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais:

Foram utilizados 57 ratos de mesma linhagem (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), machos, com idade entre 60 e 90 dias e peso variando entre 200 e 300 gramas, sendo eles procedentes do Biotério Central da Unicamp. Todos os animais foram mantidos, durante as fases de pré-tratamento e pré-operatória até o sacrifício, em gaiolas de policarbonato, que se encontraram em local com temperatura e umidade controladas e com um ciclo alternado de 12 horas claro-escuro. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água “*ad libitum*”, diariamente. O projeto desta pesquisa, protocolado sob o número 640-1, foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (Anexo).

4.2 Grupos experimentais:

A amostra foi dividida aleatoriamente em quatro grupos experimentais: grupo controle, grupo irradiado, grupo selenito de sódio e grupo selenito de sódio/irradiado. O grupo controle foi composto por 3 animais enquanto que os demais grupos foram compostos por 18 ratos. Com exceção do grupo controle, os grupos foram subdivididos em 6 sub-grupos conforme o tempo de remoção das glândulas submandibulares após a irradiação: 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas.

4.3 Tratamento com selenito de sódio:

No período de 24 horas antes da irradiação, os animais dos grupos selenito de sódio e selenito de sódio/irradiado, receberam 0,5 mg/kg de peso corpóreo de selenito de sódio (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) via intraperitoneal (Figuras 1 e 2) e nos demais foi administrada solução salina correspondente ao volume da injeção do selenito de sódio. A dose de 0,5 mg/kg de peso corpóreo foi escolhida por ter apresentado, nestas mesmas condições de administração, efeito radioprotetor nos estudos de Tuji (2001, 2004).



Figura 1 – Selenito de Sódio Pentahidratado (pró-análise).



Figura 2 – Aplicação da solução de selenito de sódio intraperitonealmente.

4.4 Irradiação:

Decorridas 24 horas da administração do selenito de sódio, todos os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio (Hypinol a 3%, Cristalia) na dose de 30mg/kg de peso. Sob o efeito da anestesia, os animais pertencentes aos grupos irradiado e selenito de sódio/irradiado, foram posicionados na mesa de radioterapia e distribuídos em uma área correspondente a 30 x 30 cm que

consistia de um campo colimado. Desta forma, somente a região da cabeça e pescoço dos animais foi irradiada com uma dose de 15 Gy de radiação gama de Co^{60} (Figuras 3 e 4), uma vez que esta dose promove saturação dos danos da radiação ionizante nas glândulas salivares (Coppes *et al.*, 2001). A distância focal correspondeu a de 80 cm e o aparelho utilizado foi da marca Alcion CGR II (Siemens) com rendimento de 107 Gy/min, operando com energia de 1,25 MeV.



Figura 3 – Proteção do restante do corpo do animal com lâmina de chumbo de 4 mm de espessura a fim de barrar a radiação secundária.



Figura 4 - Posicionamento dos animais para a exposição à radiação.

4.5 Obtenção e Preparo dos tecidos:

Após o tempo previamente estabelecido, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio, com dose de 40mg/kg de peso corpóreo para a incisão e remoção das glândulas submandibulares do lado direito (Figuras 5 e 6). Estas foram seccionadas aproximadamente em fragmentos de 1mm x 1 mm e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato, pH 7,3 0,1 M, por 6 horas a 4 °C. Posteriormente, à obtenção das peças, os animais foram sacrificados por prolongamento anestésico.



Figura 5 – Tecidos divulsionados para a remoção da glândula submandibular.



Figura 6 – Remoção da glândula submandibular.

Posteriormente a fixação, os fragmentos foram pós-fixados 1 hora em tetróxido de ósmio 1%, 0,1M tamponado em tampão fosfato pH 7,3 0,1M na temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratados em soluções crescentes de acetona 50%, 70%, 80% e 90% e finalizadas em acetona pura. Os fragmentos foram embebidos e incluídos em resina Araldite (Luft, 1961). Cortes semi-finos (1-2 μ m) foram obtidos utilizando um ultramicrótomo MT2B Sorvall Porter Blum com navalhas de vidro. Em seguida foram corados com azul de toluidina, para selecionar-se a região a ser estudada. Na seleção, a área escolhida compreendeu regiões que apresentavam porções secretoras terminais e ductos convolutos. Após a seleção, os blocos foram trimados para obtenção dos cortes ultrafinos em ultramicrótomo MT2C. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

4.6 Análise ultra-estrutural:

As grades foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão EM-10 (Zeiss, Alemanha), sendo avaliadas as alterações ultra-estruturais citoplasmáticas e nucleares das células secretoras das glândulas submandibulares em todos os grupos estudados.

5 RESULTADOS

5.1 Porção mucosa

5.1.1 Grupo Controle

Observou-se a organização das células mucosas (Figura 7), que se encontram nas porções secretoras terminais. Os grânulos de secreção encontram-se em grande quantidade e a maioria das organelas localiza-se na periferia da célula, com mitocôndrias e retículos endoplasmáticos íntegros e bem organizados (Figura 8).

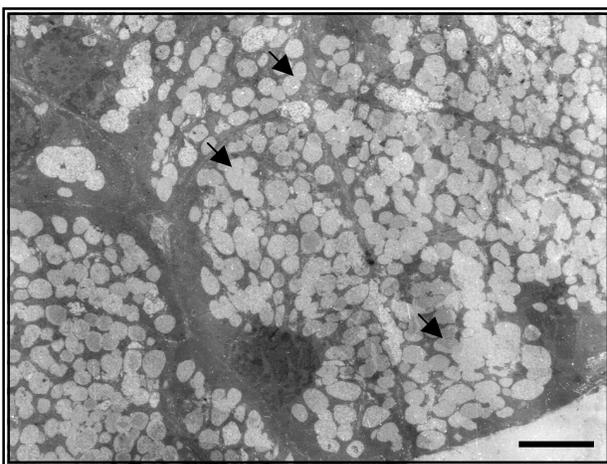


Figura 7- Células mucosas do grupo controle, com grânulos de secreção mucosos (seta) (barra= 6,9

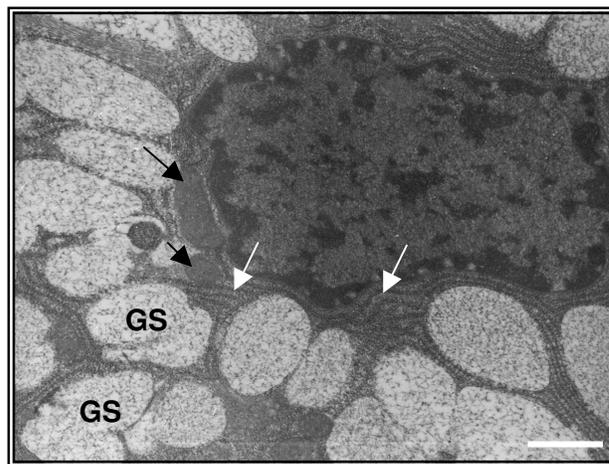


Figura 8- Célula mucosa do grupo controle com mitocôndria (seta preta), retículo endoplasmático (seta branca) e grânulos de secreção mucosos (GS) (barra = 1,1 μ m).

5.1.2 Grupo Irrradiado

A porção mucosa apresentou menor destruição que a serosa em todos os tempos estudados. A radiação causou alterações no tempo 4 horas, com vacuolização de material amorfo, alterações nucleares, grânulos unidos e de

conteúdos eletrodensos (Figuras 9 e 10). Muitos núcleos encontravam-se pleomórficos, com cromatina condensada e membranas espessadas (Figura 11). Ao redor destes, foram encontradas organelas alteradas e destruídas, tais como retículo endoplasmático e mitocôndrias. Nas 8 e 12 horas após a irradiação as alterações eram maiores, com grande destruição e desorganização tecidual (Figura 12). Muitas organelas estavam destruídas e uma moderada quantidade de grânulos possuía conteúdos fibrilares e eletrodensos em seu interior. Havia vacúolos contendo organelas destruídas e outros acrescentados com fragmentos nucleares (Figura 13).

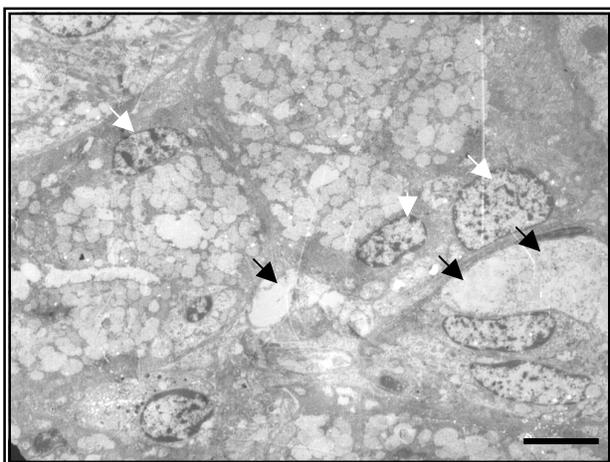


Figura 9- Campo mucoso do grupo irradiado no tempo 4 horas com vacúolos de conteúdo amorfo (seta preta) e núcleos alterados (seta branca) (barra= 8,6 μm).

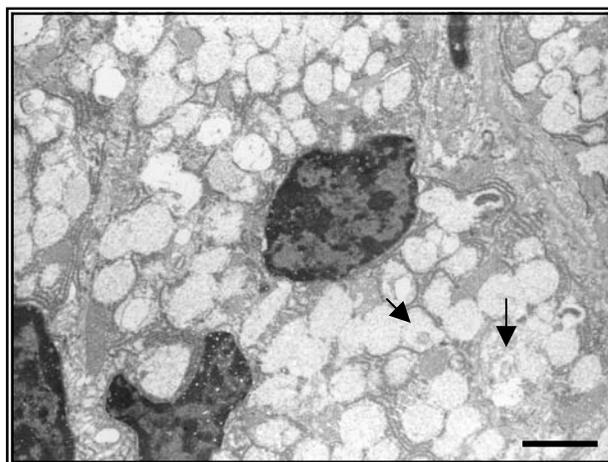


Figura 10- Célula mucosa do grupo irradiado no tempo 4 horas com grânulos de conteúdos eletrodensos (seta) (barra= 2,3 μm).

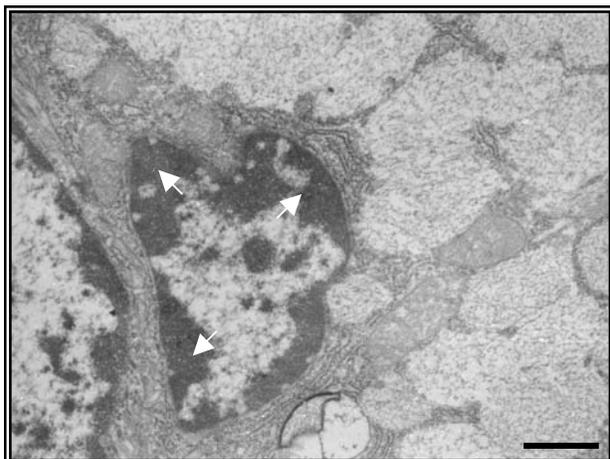


Figura 11- Núcleo mucoso do grupo irradiado no tempo 4 horas com cromatina condensada (seta) (barra= 1,1 μm).

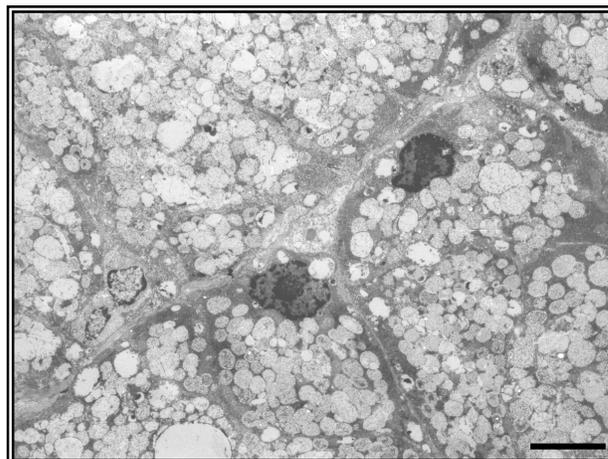


Figura 12- Células mucosas do grupo irradiado no tempo 12 horas (barra= 5,5 μm).

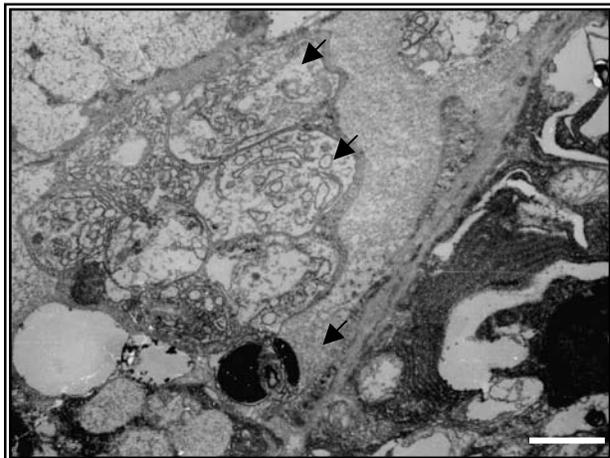


Figura 13- Vacúolos de conteúdos variados (seta) do grupo irradiado no tempo 12 horas (barra= 6,9 μm).

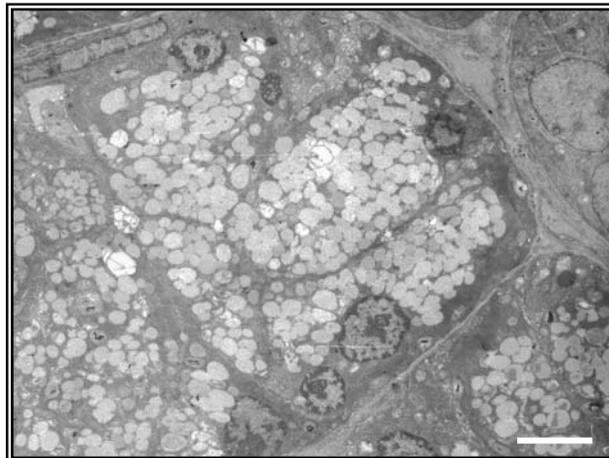


Figura 14- Campo mucoso do grupo irradiado no tempo 24 horas (barra= 6,9 μm).

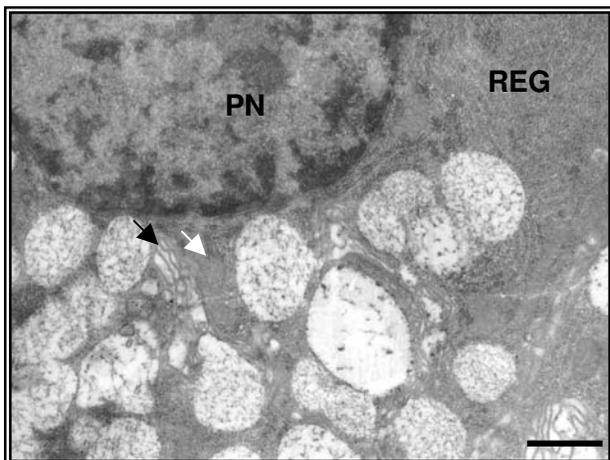


Figura 15- Porção nuclear (PN), mitocôndria (seta branca), retículo endoplasmático rugoso (REG) e complexo de Golgi (seta preta) íntegros no grupo irradiado no tempo 24 horas (barra= 1,1 μm).

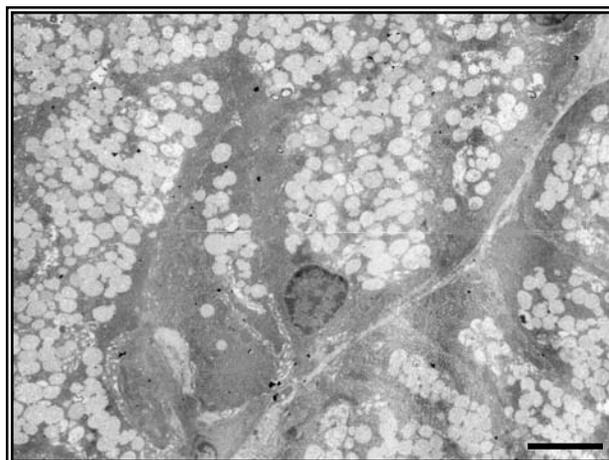


Figura 16- Células mucosas do grupo irradiado no tempo 48 horas (barra= 6,9 μm).

A partir das 24 horas, houve diminuição da quantidade de vacúolos (Figura 14), aumento do número de núcleos com nucléolos aumentados e de organelas íntegras (Figura 15). Entretanto, muitas células ainda demonstravam alterações nucleares. Nos últimos tempos (48 e 72 horas), observou-se maior reorganização tecidual, com porções mais íntegras (Figura 16) e outras com grandes vacúolos presentes de forma localizada. Estes vacúolos se apresentavam ora com conteúdos amorfos, ora com conteúdos originários do citoplasma e/ ou do

núcleo (Figura 17). Observou-se maior quantidade de organelas íntegras, principalmente retículo endoplasmático, mitocôndrias e complexo de Golgi (Figura 18), embora ainda fossem encontradas alterações nucleares.

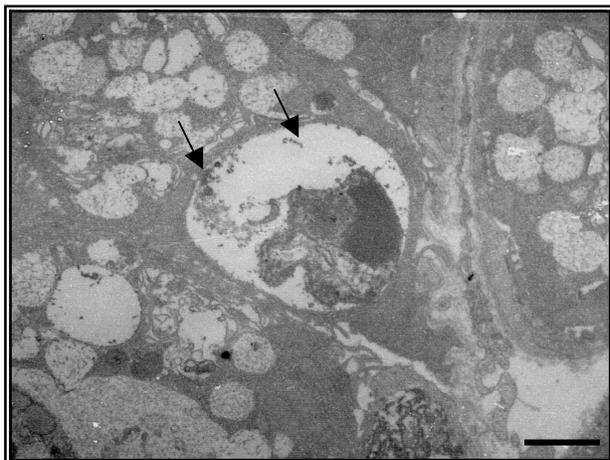


Figura 17- Vacúolos nas porções basais (seta) das células mucosas do grupo irradiado no tempo 72 horas (barra= 2,3 µm).

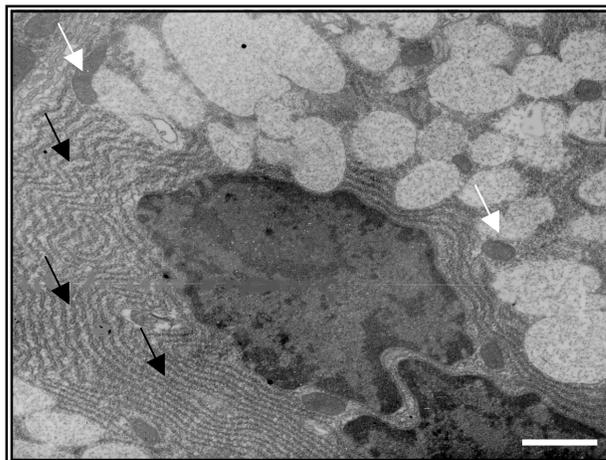


Figura 18- Célula mucosa do grupo irradiado no tempo 48 horas apresentando grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (seta preta) e mitocôndria (seta branca) (barra= 1,4 µm).

5.1.3 Grupo Selenito de sódio

O selenito de sódio também causou as mesmas alterações observadas no grupo irradiado, mas com menor intensidade. Após 4 horas (Figura 19), observou-se vacúolos de tamanhos variáveis contendo material amorfo ou inclusões do citoplasma, com destruição de uma moderada quantidade de organelas, principalmente mitocôndrias e retículo endoplasmático. Havia núcleos com espessamento de membrana nuclear e cromatina condensada. Nas 8 horas (Figura 20), foram encontradas as mesmas alterações do tempo anterior, mas com uma maior desorganização tecidual e uma maior quantidade de grandes vacúolos com conteúdos amorfos (Figura 21) e outros com inclusões citoplasmáticas. A partir das 12 horas o grupo selênio demonstrou diminuição progressiva das alterações (Figuras 22), com o aumento da quantidade de células íntegras nos

períodos restantes (Figuras 23 e 24), apesar de ainda serem encontrados núcleos alterados e vacúolos com materiais amorfos, citoplasmáticos e/ ou nucleares.

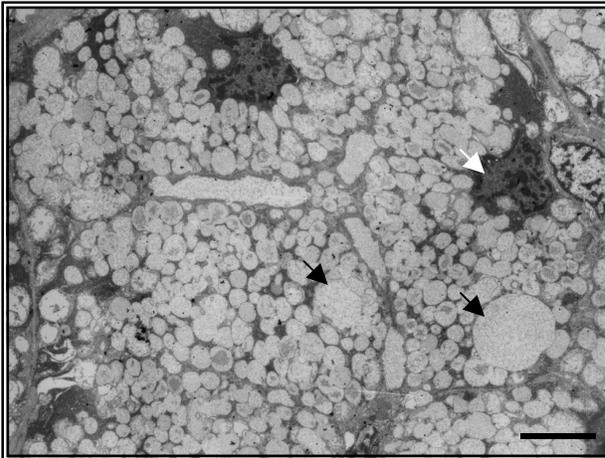


Figura 19- Células mucosas do grupo selenito de sódio no tempo de 4 horas apresentando vacúolos (seta preta) e núcleos alterados (seta branca) (barra= 6,9 μm).

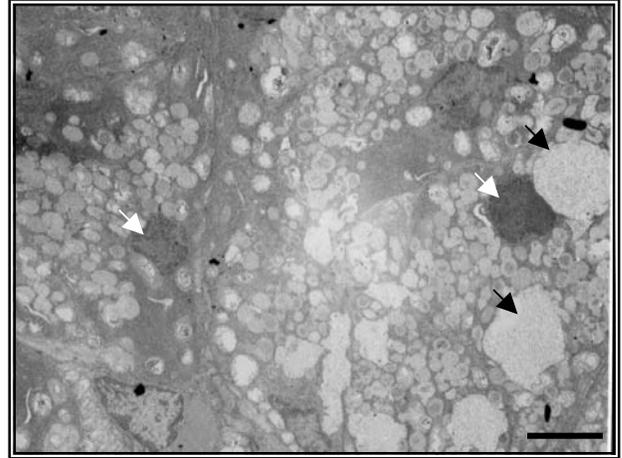


Figura 20- Células mucosas do grupo selenito de sódio no tempo de 8 horas com vacúolos (seta preta) e núcleos alterados (seta branca) (barra= 6,9 μm).

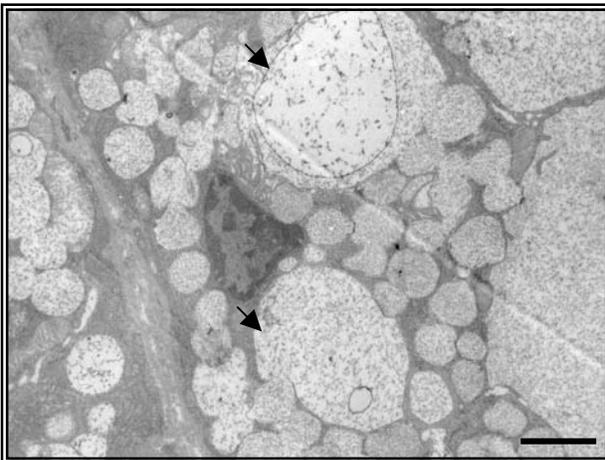


Figura 21- Vacúolos com material amorfo (seta) nas células mucosas do grupo selenito de sódio no tempo de 8 horas (barra= 2,3 μm).



Figura 22- Células mucosas do grupo selenito de sódio no tempo de 12 horas (barra= 6,9 μm).

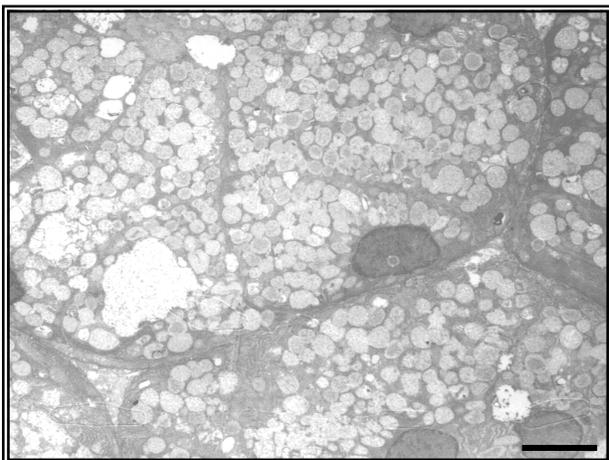


Figura 23- Células mucosas do grupo selenito de sódio no tempo de 72 horas (barra= 6,9 μm).

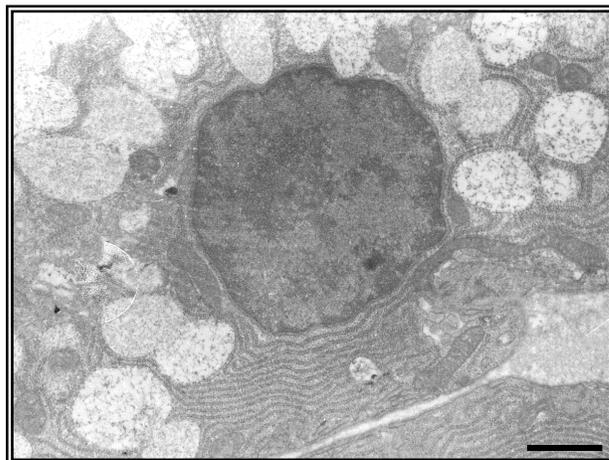


Figura 24- Núcleo e organelas íntegras vista de uma célula mucosa do grupo selenito de sódio no tempo de 48 horas (barra= 1,4 μm).

5.1.4 Grupo Selenito de sódio/irradiado

Desde o período de 4 horas, o grupo selenito de sódio/irradiado demonstrou alterações semelhantes aos grupos irradiados e selenito de sódio, mas em menor intensidade (Figura 25). Foram encontradas organelas íntegras, grânulos com aspecto normais e poucas alterações nucleares. Também observou-se vacúolos contendo inclusões citoplasmáticas e outros com material nuclear, além da presença de vacúolos vazios pequenos. A partir das 8 horas, houve diminuição progressiva das alterações (Figura 26), apresentando a maioria dos vacúolos localizada na porção apical da célula e o aumento de organelas íntegras (Figura 27). As alterações diminuíram e tornaram-se mais escassas com o aumento dos tempos estudados (Figura 28). Nos últimos períodos, foram raros vacúolos, degenerações de componentes dos citoplasmas, bem como alterações nucleares (Figuras 29 e 30), assemelhando-se ao grupo controle.

Resultados

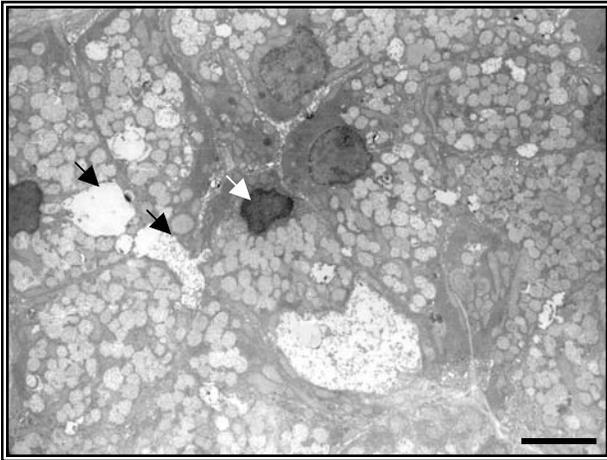


Figura 25- Células mucosas do grupo selenito de sódio/irradiado no tempo de 4 horas com vacúolos (seta preta) e núcleos alterados (seta branca) (barra= 6,9 μm).

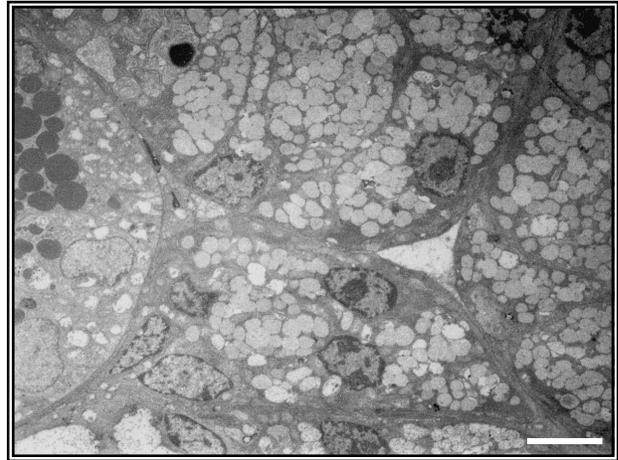


Figura 26- Células mucosas do grupo selenito de sódio/irradiado no tempo de 8 horas (barra= 6,9 μm).

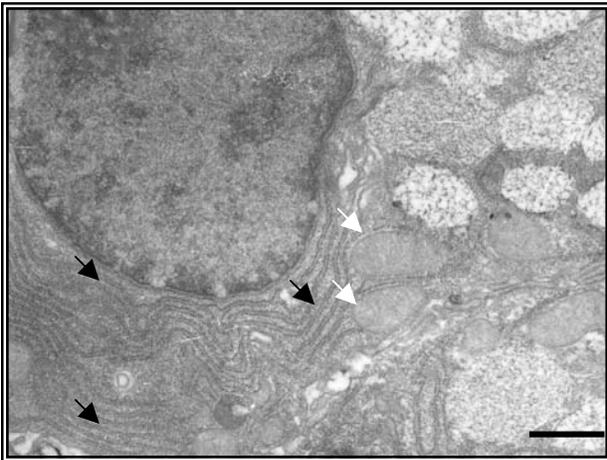


Figura 27- Retículo endoplasmático rugoso (seta preta) e mitocôndria íntegras (seta branca) de uma célula mucosa do grupo selenito de sódio/irradiado no tempo de 8 horas (barra=1,4 μm).

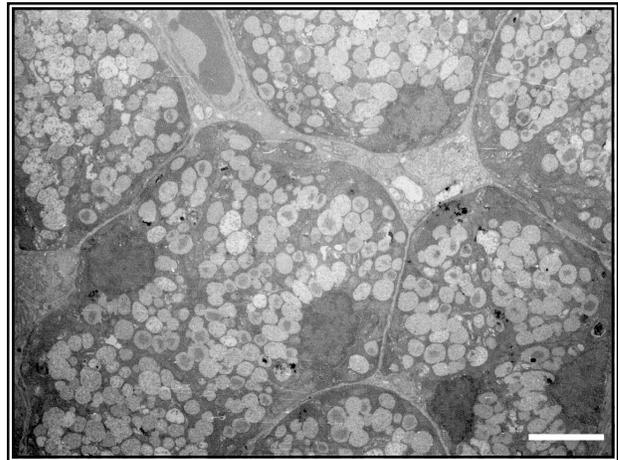


Figura 28- Células mucosas do grupo selenito de sódio/irradiado no tempo de 24 horas (barra= 6,9 μm).

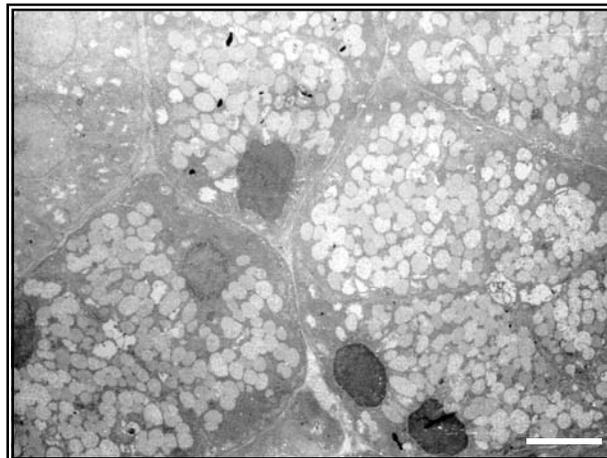


Figura 29- Células mucosas do grupo selenito de sódio/irradiado no tempo de 72 horas (barra= 6,9 μm).

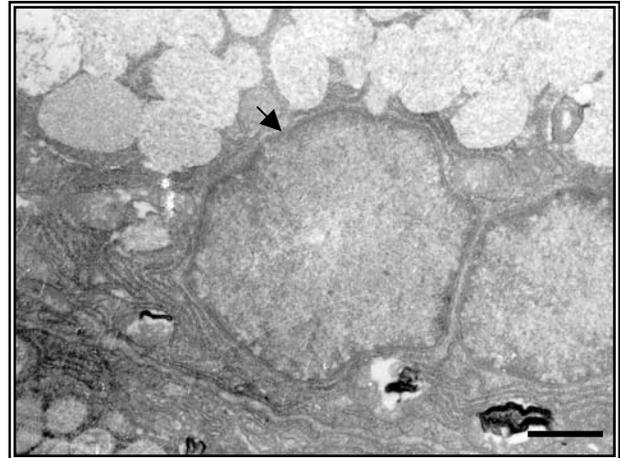


Figura 30- Núcleo normal (seta preta) de uma célula do grupo selenito de sódio/irradiado no tempo 72 horas, (barra=1,4 μm).

5.2 Porção Serosa

5.2.1 Grupo Controle

Observou-se a integridade das células serosas presentes no ducto convoluto granular (Figura 31). Diferente das células mucosas, as células serosas apresentavam núcleos menos eletrodensos e grânulos de secreção mais eletrodensos, com as organelas distribuídas por toda a célula (Figura 32).

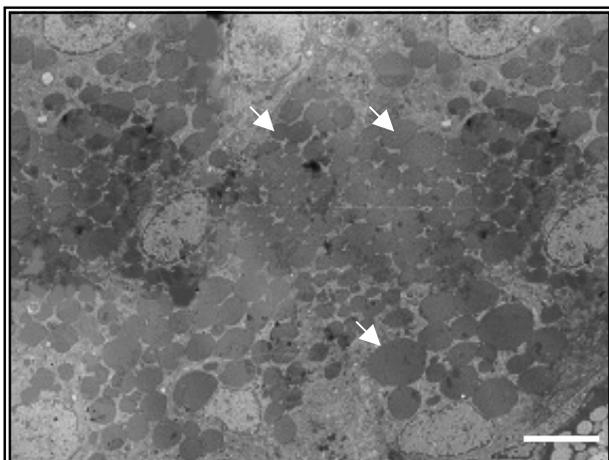


Figura 31- Células serosas do grupo controle com grânulos de secreção serosa (seta) (barra= 6,9 µm).

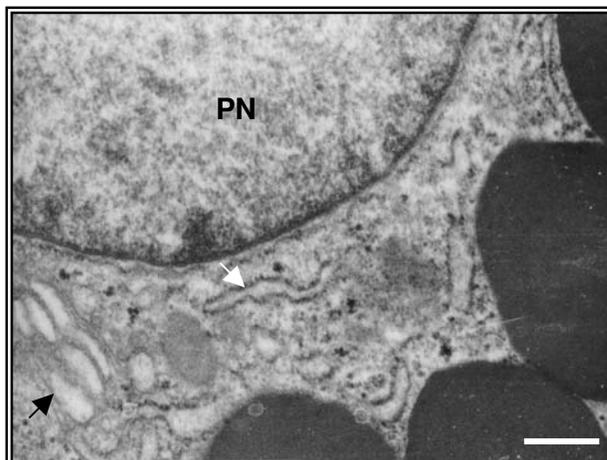


Figura 32- Porção nuclear (PN), complexo de Golgi (seta preta), retículo endoplasmático rugoso (seta branca), de uma célula serosa do grupo controle (barra= 0,44 µm).

A radiação produziu desde o primeiro tempo estudado (4 horas), vacúolos de tamanhos variados e ausência freqüente de grânulos de secreção nestas células (Figura 33). Quando presentes, os grânulos encontravam-se sem limites definidos e unidos entre si, sugerindo o rompimento de membrana. As organelas apresentaram-se destruídas e, devido a lise de retículos endoplasmáticos rugosos, havia aumento de ribossomos livres (Figura 34). Além da lise, os espaços entre as cristas mitocondriais estavam maiores. Houve ainda pleomorfismo, condensação de cromatina e espessamento de membrana nuclear.

Nos tempos de 8 e de 12 horas, as células serosas sofreram maiores alterações, com grande desorganização celular, freqüência de vacúolos, número de alterações nucleares (Figuras 35 e 36), intensidade da destruição de grânulos de secreção e de organelas. Os vacúolos possuíam material amorfo, debris de organelas e/ ou nucleares, que alguns eram representados por células destruídas. Os grânulos apresentavam-se sem limites definidos, unidos e com alteração de eletrodensidade (Figura 37). Nas 24 horas, o grupo irradiado passou a apresentar algumas regiões mais conservadas (Figura 38), com células sem alterações nucleares, todavia continuava desorganizada em sua maioria, com intensa quantidade de vacúolos de tamanhos variados, degeneração das estruturas citoplasmáticas e nucleares. Nos tempos restantes as alterações diminuíram (Figura 39), observando-se redução na quantidade de núcleos alterados, organelas destruídas e de vacúolos, estando estes mais localizados na porção basal das células (Figura 40).

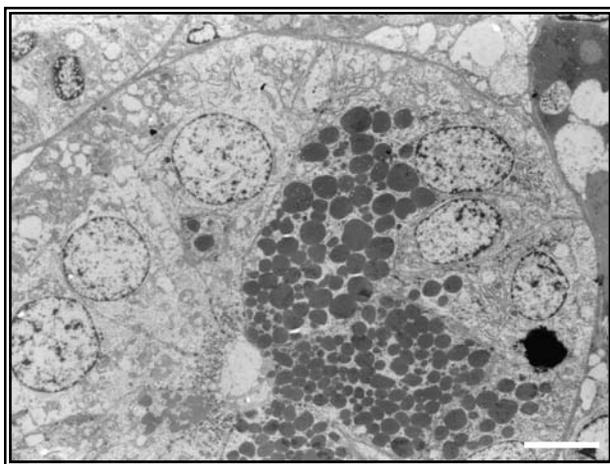


Figura 33- Células serosas do grupo irradiado após 4 horas da irradiação (barra= 6,9 μm).

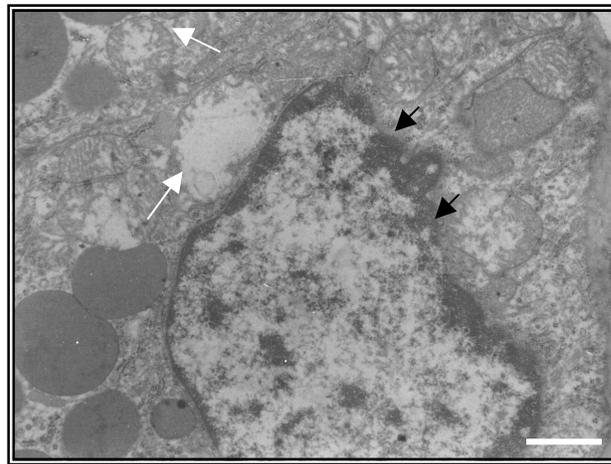


Figura 34- Espessamento de membrana nuclear (seta preta), degeneração de organelas (seta branca) e aumento de polirribossomos livres no citoplasma de uma célula serosas do grupo irradiado no tempo 4 horas (barra= 1,1 μm).

Resultados

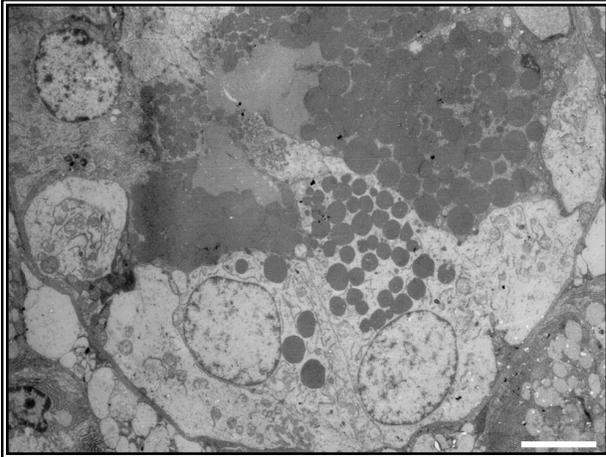


Figura 35- Células serosas do grupo irradiado após 8 horas da irradiação, com maior destruição e desorganização (barra= 8,6 μ m).

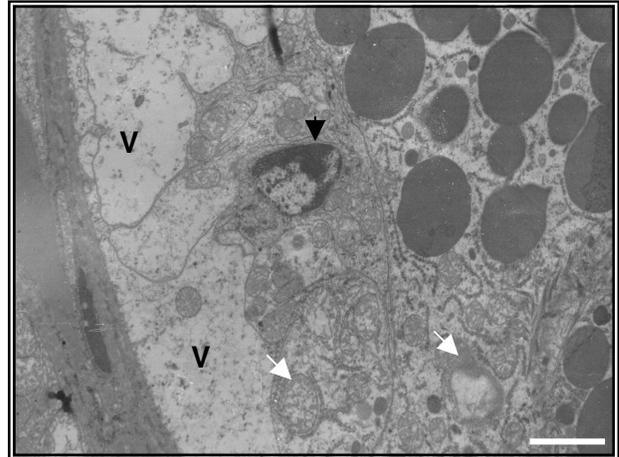


Figura 36- Foram encontrados vacúolos (V) e alteração nuclear (seta preta) e citoplasmática (seta branca) nas células serosas do grupo irradiado no tempo 8 horas (barra= 2,8 μ m).

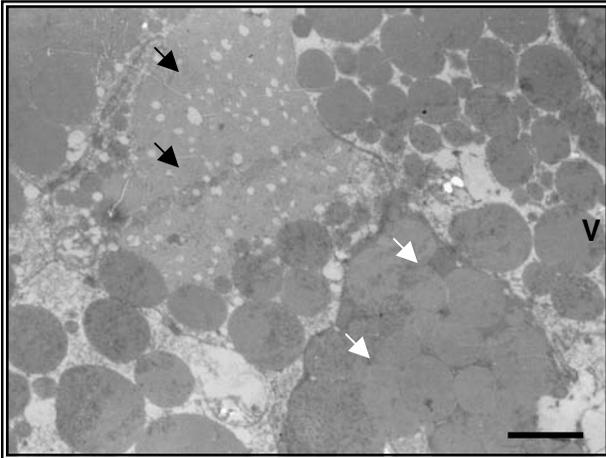


Figura 37- União (seta branca) e alteração de eletrodensidade (seta preta) dos grânulos de secreção das células serosas do grupo irradiado no tempo 8 horas (barra= 1,8 μ m).

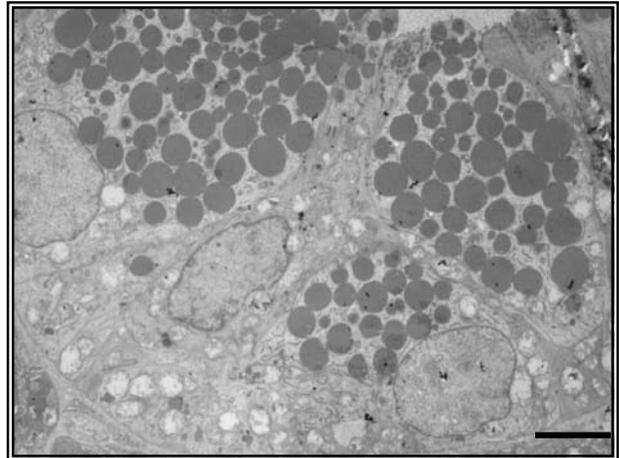


Figura 38- Células serosas mais íntegras do grupo irradiado após 24 horas da irradiação (barra= 6,9 μ m).

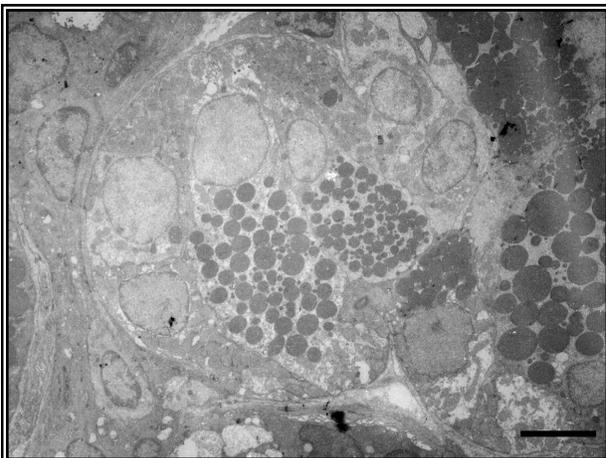


Figura 39- Células serosas do grupo irradiado após 72 horas da irradiação (barra= 6,9 μ m).

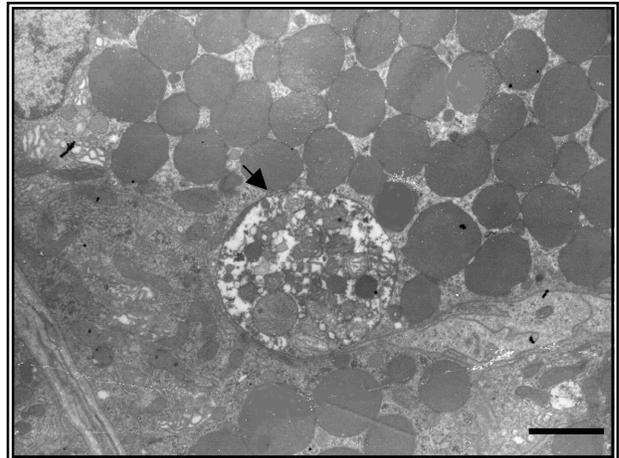


Figura 40- Vacúolo (seta) localizado na porção basal de uma célula serosa do grupo irradiado no tempo de 48 horas (barra= 2,3 μ m).

5.2.3 Grupo Selenito de sódio

Inicialmente, ocorreu semelhança deste grupo em relação ao grupo irradiado (Figura 41), diferenciando-se apenas pela maior integridade dos núcleos (Figura 42). Nas 8 horas houve diminuição considerável da quantidade de vacúolos (Figura 43), da destruição de organelas e das alterações nucleares. A intensidade das alterações foi semelhante nos tempos de 12 e de 24 horas, apresentando redução (Figura 44), embora ainda fosse encontrada a destruição de organelas, vacúolos e algumas alterações nucleares (Figura 45). A maioria dos vacúolos era pequena e geralmente continha mitocôndrias destruídas. Nas 48 e nas 72 horas, os vacúolos maiores tornaram-se mais escassos (Figura 46). O mesmo ocorreu para as lises de organelas e alterações nucleares (Figura 47). Salienta-se que a ocorrência da vacúolos foi menos freqüente no último período estudado.

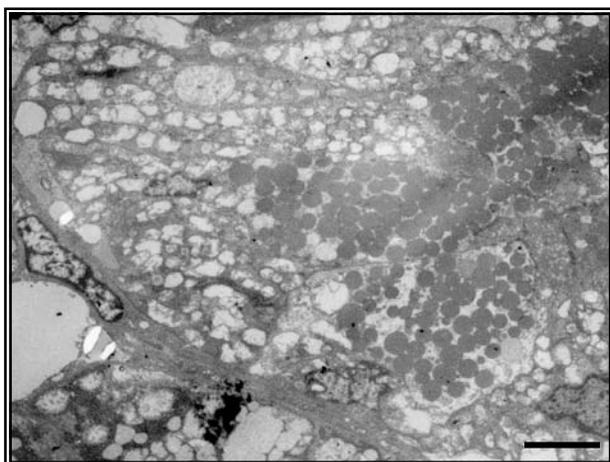


Figura 41- Células serosas do grupo selenito de sódio após 4 horas da simulação (barra= 6,9 μ m).

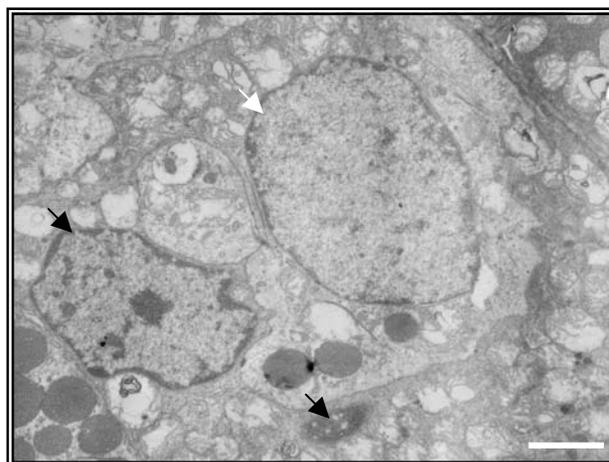


Figura 42- Núcleos serosos com (seta preta) e sem alteração (seta branca) nuclear de células serosas do grupo selenito de sódio no tempo de 4 horas da simulação da irradiação (barra=2,3 μ m).

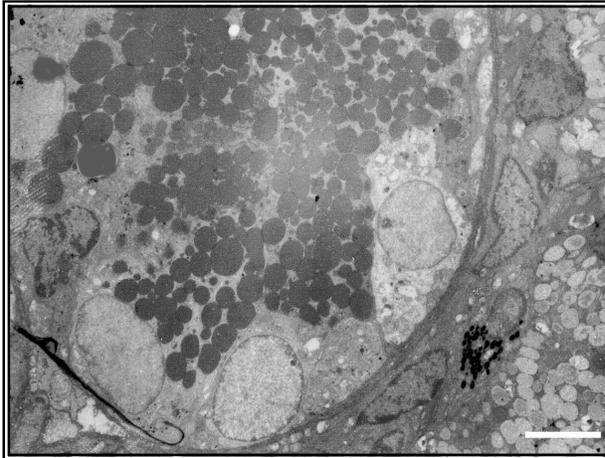


Figura 43- Células serosas do grupo selenito de sódio após 8 horas da simulação (barra= 6,9 μ m).

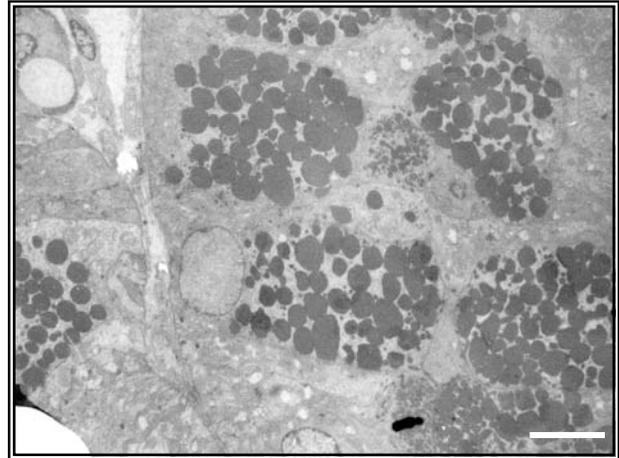


Figura 44- Células serosas do grupo selenito de sódio após 12 horas da simulação (barra= 6,9 μ m).

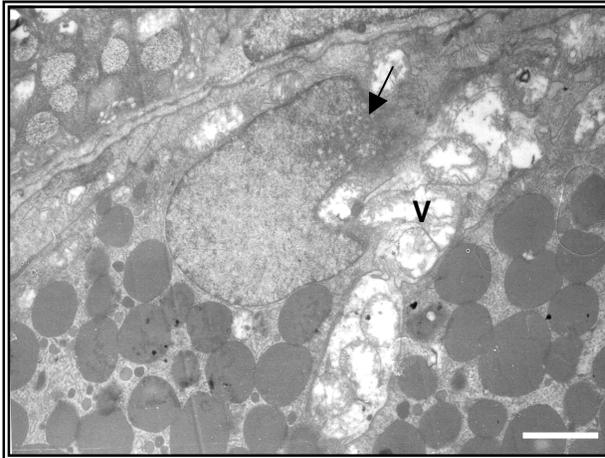


Figura 45- Vacúolo (V) com organelas degeneradas e alteração nuclear (seta) do grupo selenito de sódio após 24 horas (barra= 2,3 μ m).

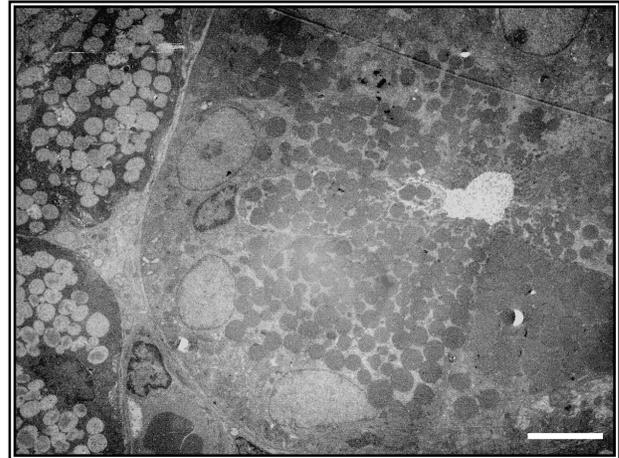


Figura 46- Células serosas do grupo selenito de sódio após 72 horas da simulação (barra= 6,9 μ m).

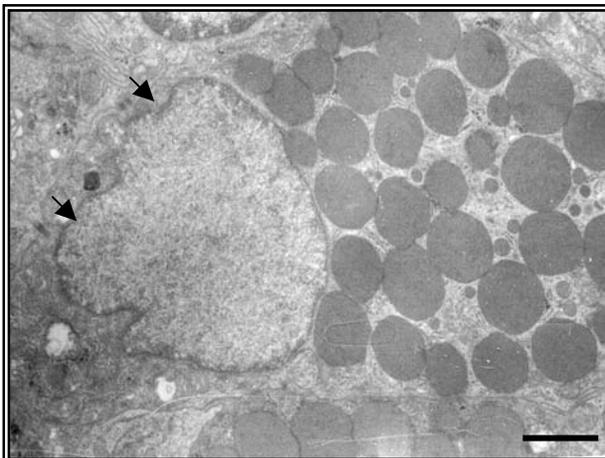


Figura 47- Célula serosa do grupo selenito de sódio após 72 horas sem alteração no núcleo (seta) e com poucas organelas degeneradas (barra= 2,3 μ m).

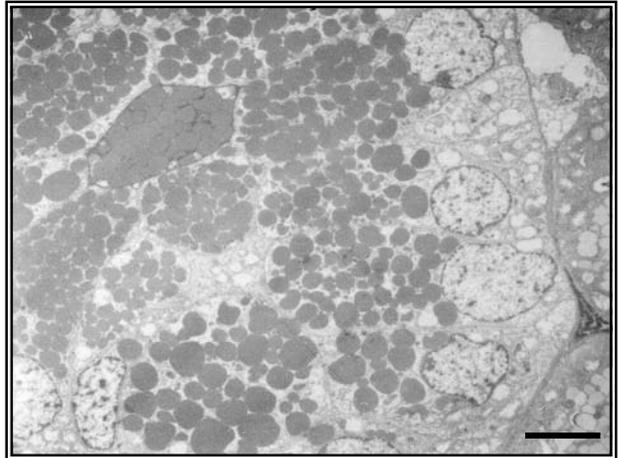


Figura 48- Células serosas do grupo selenito de sódio/irradiado após 4 horas (barra= 6,9 μ m).

5.2.4 Grupo Selenito de sódio/irradiado

Este grupo apresentou similaridade na intensidade das alterações com os grupos irradiado e selenito de sódio no primeiro tempo estudado, exceto pela maior preservação dos grânulos de secreção (Figuras 48 e 49). Nos períodos de 8 e de 12 horas ocorreu semelhança com o grupo selenito de sódio (Figuras 50 e 51), mas a partir do tempo de 24 horas as alterações foram menores em relação a todos os grupos estudados (Figura 52). Os vacúolos apresentavam-se menores e mais raros, as alterações nucleares eram mais escassas à medida que os grânulos de secreção e organelas íntegras encontravam-se em maior número. No último tempo estudado, ocorreu maior organização e integridade celular que nos grupos restantes e o tempo 48 horas (Figura 53). As alterações foram raramente encontradas, com organelas íntegras e núcleos com características de normalidade (Figura 54). As organelas apresentavam-se em grande número, bem como os grânulos de secreção, embora estes últimos estivessem ausentes em algumas células.

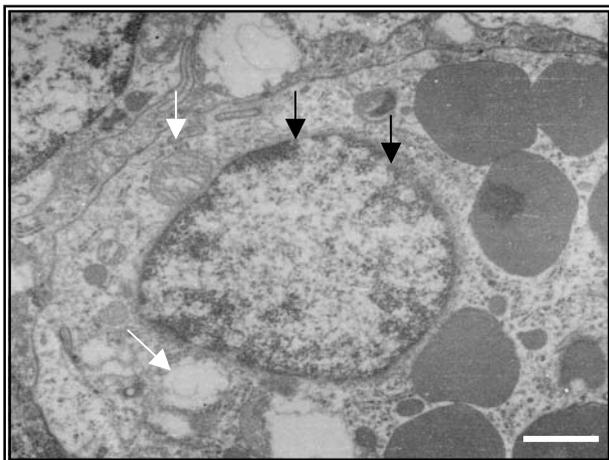


Figura 49- Núcleo (seta preta) e organelas degeneradas (seta branca) de uma célula serosa do grupo selenito de sódio/irradiado no tempo de 4 horas (barra= 1,1 μm).

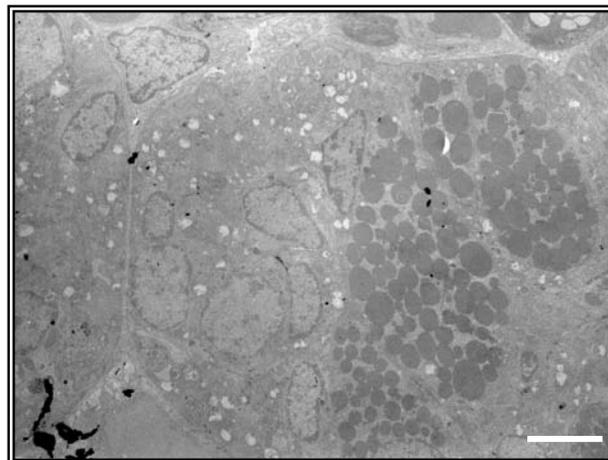


Figura 50- Células serosas do grupo selenito de sódio/irradiado após 12 horas (barra= 8,6 μm).

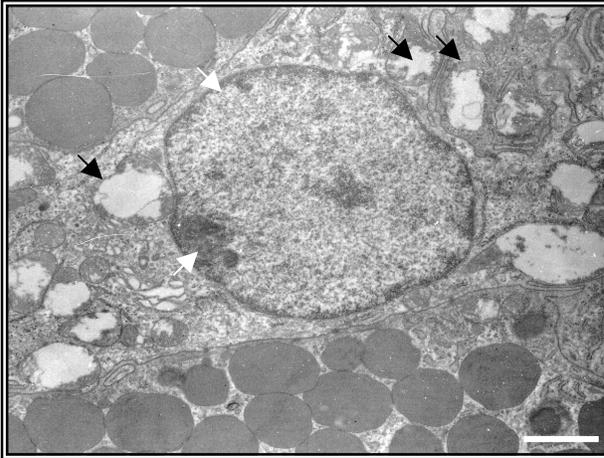


Figura 51- Degeneração de componentes do citoplasma (seta preta) ao redor de um núcleo sem alteração (seta branca) de uma célula do grupo selenito de sódio/irradiado no tempo de 12 horas (barra=1,1 μm).

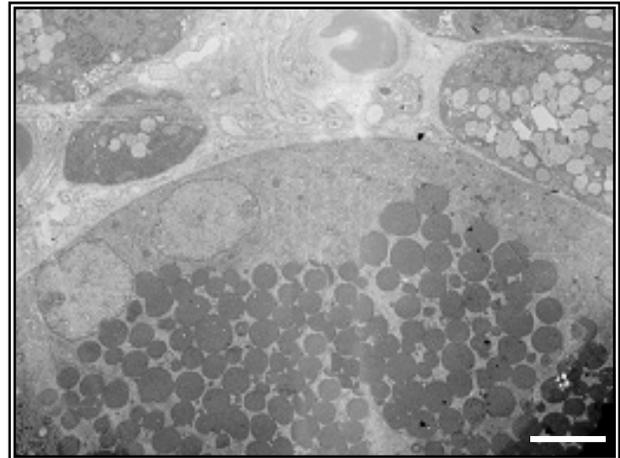


Figura 52- Células serosas do grupo selenito de sódio/irradiado após 24 horas (barra=6,9 μm).

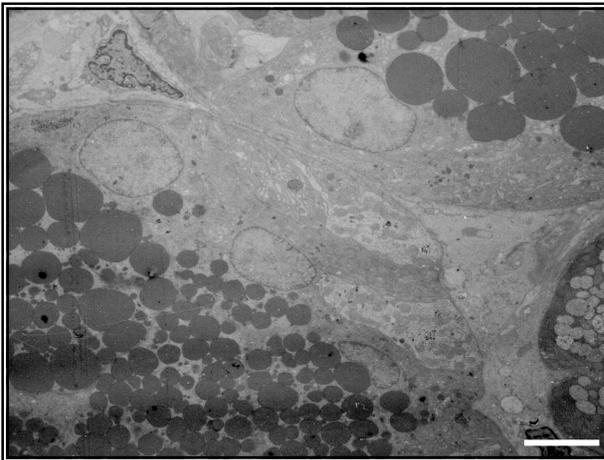


Figura 53- Células serosas do grupo selenito de sódio/irradiado após 72 horas (barra= 6,9 μm).

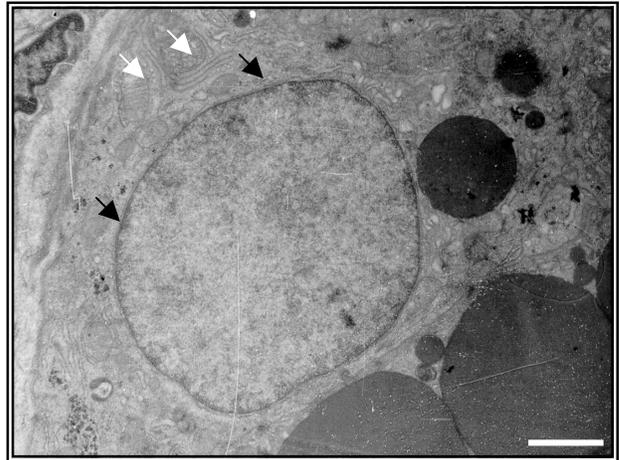


Figura 54- Célula serosa do grupo selenito de sódio/irradiado após 72 horas apresentando núcleo (seta preta) e organelas íntegras (seta branca) (barra= 1,8 μm).

6 DISCUSSÃO

Pelo fato das glândulas salivares serem compostas por grande número de células epiteliais diferenciadas, que se encontram predominantemente na intérfase, seria esperado que fossem radiorresistentes, mas sabe-se que a morte aguda destas células ocorre a partir do primeiro dia da exposição a doses baixas de radiação (Peter *et al.*, 1994). Existem hipóteses que tentam explicar esta radiosensibilidade, pela presença dos grânulos de secreção (Abok *et al.*, 1984; Norberg *et al.*, 1988; Ahlner *et al.*, 1994; Nagler & Laufer, 1998), bloqueio nos nervos simpáticos (Kohn *et al.*, 1992) e redução da capacidade de ingestão pela síndrome orofaríngea (Nagler *et al.*, 1996).

As células serosas são consideradas mais radiosensíveis que as células mucosas, enquanto que as células ductais parecem ser relativamente radiorresistentes (Peter *et al.*, 1994; Henriksson *et al.*, 1994). A maior radiosensibilidade das células serosas é explicada pela hipótese lançada por Abok *et al.* (1984), segundo a qual os grânulos de secreção serosos possuem enzimas proteolíticas e metais de transição, enquanto que os grânulos de secreção mucosos contêm principalmente glicoproteínas. Os metais de transição são conhecidos por promover a indução do stress oxidativo, potencializando o dano nas membranas dos grânulos serosos. Como consequência, as enzimas proteolíticas podem se infiltrar e danificar o citoplasma, causando autólise e morte celular.

De acordo com a hipótese dos grânulos de secreção, Abok *et al.* (1984), além de comprovarem a presença dos íons ferro, cobre e manganês nos grânulos serosos, verificaram menor dano nas células serosas das glândulas submandibulares quando estas foram tratadas previamente com substâncias desgranulantes como noradrenalina, fenilefrina, ciclotidina ou pilocarpina, ao passo que o dano nas células serosas foi maior após o estímulo do aumento de grânulos pela atrofina. Após esse estudo, foram realizados trabalhos posteriores por Norberg *et al.* (1988), Ahlner *et al.* (1994), Nagler *et al.* (1997), Nagler & Laufer (1998), Coppes *et al.* (2002), que confirmaram o envolvimento dos grânulos de secreção serosos no aumento do dano causado pela radiação ionizante. Portanto, esta hipótese explica a grande radiosensibilidade das glândulas parótidas, compostas em sua maioria por células secretoras serosas, observada através de análise ultra-estrutural (Pratt & Sodicoff, 1972; Sholley *et al.*, 1974; Stern *et al.*, 1976), histomorfológica (Roslindo *et al.*, 1989 e Stephens *et al.*, 1989; Henriksson *et al.*, 1994), e funcional (Mossman *et al.*, 1981; Vissink *et al.*, 1991a; Nagler *et al.*, 1993a).

Comparando-se com a glândula parótida, muitos trabalhos explicam a maior radiorresistência da glândula submandibular por possuir menor quantidade de células secretoras serosas, que em ratos, encontram-se apenas nos ductos convolutos granulares (Vissink *et al.*, 1991a; Nagler *et al.*, 1993a, 1993b; Henriksson *et al.*, 1994; O'Connell *et al.*, 1999). Embora a maioria dos estudos concorde com a maior resistência das glândulas submandibulares, Coppes *et al.* (2002) observaram maior radiosensibilidade aos efeitos tardios da exposição a doses fracionadas na função e histomorfologia e explicaram ser devido à reduzida capacidade das células dos ductos intercalados de originar novas células acinares. Já Vissink *et al.* (1990), não encontraram diferenças na função entre as glândulas salivares, durante os períodos agudo e inicial. A radiação empregada causou processos degenerativos em ambos tipos de células secretoras, porém

com uma maior destruição para as células serosas, concordando com os achados de Stern *et al.* (1976) e Vissink *et al.* (1991b) na ultra-estrutura, de Norberg *et al.* (1988), Henriksson *et al.* (1994) e O'Connell *et al.* (1999) na histomorfologia.

A radiação causou logo no primeiro tempo, alterações como a diminuição e a destruição dos grânulos de secreção, a destruição de organelas, a condensação de cromatina, o espessamento de membrana nuclear, pleomorfismo nuclear e vacúolos de conteúdos citoplasmáticos, nucleares ou amorfos. Estas alterações estão de acordo com as observadas pelos estudos de Reade & Steidler (1985) e de Vissink *et al.* (1991) na ultra-estrutura de glândulas submandibulares.

No presente estudo, dentre as organelas mais acometidas pela radiação, destacam-se as mitocôndrias e os retículos endoplasmáticos rugosos. A lise dos retículos endoplasmáticos rugosos aumentou a concentração de polirribossomos livres no citoplasma, também encontrado por Stern *et al.* (1976), Reade & Steidler (1985) e por Vissink *et al.* (1991a). A grande radiosensibilidade das mitocôndrias, observada também em estudos envolvendo as glândulas submandibulares (Messelt & Dahl, 1983; Stern *et al.*, 1976; Reade & Steidler, 1985 e Vissink *et al.*, 1991a) e as glândulas parótidas (Pratt & Sodicoff, 1972; Sholley *et al.*, 1974; Stern *et al.* 1976), é explicada por constituírem o maior sítio de produção de radicais superóxidos (Nagler *et al.*, 2000).

A destruição dos grânulos de secreção associada com a união destes, bem como a diminuição de seu número observadas logo nos primeiros tempos avaliados, ocorreram também nos estudos em células serosas das glândulas parótidas (Pratt & Sodicoff, 1972; Sholley *et al.*, 1974; Stern *et al.*, 1976; Stephens *et al.*, 1989) e das glândulas submandibulares (Stern *et al.*, 1976; Reade & Steidler, 1985; Vissink *et al.*, 1991^a e Ahlner *et al.*, 1994). Nos grânulos mucosos, além

dessas alterações, foram encontradas em seu interior, fibrilas eletrodensas, corroborando com Vissink *et al.* (1991a), no que estes autores sugerem ser um sinal de reparo e regeneração.

Além da diminuição dos grânulos de secreção pela destruição, esta é também sugerida como causada pelo aumento da concentração de catecolaminas que causa um maior estímulo α -adrenérgico, inibindo a produção de grânulos de secreção pelas células secretoras (Reade & Steidler, 1985; Vissink *et al.*, 1991b).

As alterações nucleares foram encontradas neste estudo e também em outros estudos ultra-estruturais (Stern *et al.*, 1976; Reade & Steidler, 1985; Vissink *et al.*, 1991a) e histomorfológicos (Vissink *et al.*, 1991a, 1991b) nas células secretoras das glândulas submandibulares. Dentre estas alterações, destaca-se a condensação de cromatina, indicando apoptose (Rafferty *et al.*, 2003). Além da condensação de cromatina, foram também encontradas lise nuclear, menor eletrodensidade da eucromatina, caracterizando, segundo Rafferty *et al.* (2003), necrose celular. Durante a recuperação celular, ocorrida a partir do período de 24 horas, foi encontrado o aumento do tamanho de nucléolos e da quantidade de organelas, principalmente o retículo endoplasmático, concordando com os trabalhos de Reade & Steidler (1985) e de Vissink *et al.* (1991a), sendo indício de regeneração ativa (Vissink *et al.*, 1991a).

Apesar das alterações mostrarem-se mais acentuadas para as células serosas, a resposta na intensidade de acordo com os tempos estudados apresentou-se de forma semelhante. Em ambos os tipos de células secretoras, observaram-se alterações desde o primeiro tempo estudado, sendo também encontrado, mesmo utilizando dose de radiação inferior, nas células serosas dos ductos convolutos pelos estudos ultra-estruturais, imunohistoquímicos e

histomorfológicos de Reade & Steidler (1985), em que observaram desgranulação celular, concomitante à diminuição da marcação do fator de crescimento e aos grânulos com membranas unidas. Além da desgranulação observada em microscopia de luz, Vissink *et al.* (1991b) e Peter *et al.* (1994), relataram que nas primeiras horas ocorreram em ambas as células secretoras, aberrações nucleares e vacuolização. Na análise por microscopia eletrônica, Vissink *et al.* (1991a) encontraram nas três horas após a irradiação, mitocôndrias intumescidas, fibrilas eletrodensas em grânulos das células mucosas e células serosas parcialmente danificadas. Nas células serosas de glândulas parótidas de ratos, Tuji (2004) observou alterações citoplasmáticas e nucleares 4 horas após a irradiação. As alterações encontradas no primeiro tempo estudado foram similares às observadas por Reade & Steidler (1985), Vissink *et al.* (1991a, 1991b), Peter *et al.* (1994) e Tuji (2004), mas discordam da avaliação ultra-estrutural de Stern *et al.* (1976) que observaram as primeiras alterações a partir do quarto dia e da análise histomorfológica realizada por Henriksson *et al.* (1994), nas quais não foram encontradas alterações durante a fase aguda, podendo ser explicado pela maior radorresistência das glândulas salivares de ratos fêmeas (Abok *et al.*, 1984) e pela menor sensibilidade do método histomorfológico.

Contudo, em consideração ao tempo de maior intensidade de destruição, há concordância apenas com o trabalho realizado por Tuji (2004) nas células serosas das glândulas parótidas de ratos. No presente estudo, houve maior intensidade nos tempos de 8 e de 12 horas para ambas células, mas nos estudos de Stern *et al.* (1976), as primeiras e grandes alterações ocorreram no quarto dia. Já Reade & Steidler (1985), utilizando a dose de 8 Gy de radiação X, encontraram nas 48 horas, enquanto que Vissink *et al.* (1991a) observaram por microscopia de luz e eletrônica nas 72 horas, ocorrendo o mesmo na avaliação histomorfológica realizada por Peter *et al.* (1994). Em relação ao período de diminuição das destruições no presente estudo, foram observados indícios de

recuperação a partir das 24 horas, com diminuição dos danos no último tempo estudado. Este resultado foi igual ao encontrado por Tuji (2004) e diferente de outras pesquisas, nas quais os indícios de recuperação apareceram a partir do sexto dia (Vissink *et al.*, 1991a, 1991b; Peter *et al.*, 1994).

Em vista de se evitar ou atenuar os efeitos da radiação ionizante nas glândulas submandibulares, são estudadas substâncias radioprotetoras que atuam por meio da desgranulação prévia à irradiação (Roesink *et al.*, 1999; Coppes *et al.*, 2001) do estímulo a proliferação celular (Furuno *et al.*, 1974; Peter *et al.*, 1994; Coppes *et al.*, 1997) e da ação antioxidante (Sodicoff *et al.*, 1978; Sodicoff *et al.*, 1979; Sodicoff & Conger, 1983a, 1983b; Bohuslavizki *et al.*, 1999; Nagler *et al.*, 2000; Tuji, 2004). De acordo com Aruoma (1996), visando estabelecer um equilíbrio quanto à presença de radicais livres, os antioxidantes endógenos e exógenos podem inibir o stress oxidativo, por meio da diminuição da concentração de oxigênio, da ligação aos íons metálicos catalisadores e da quebra de peróxidos em produtos não tóxicos. Nos animais existem linhas de defesa, como os antioxidantes glutatona e as enzimas antioxidantes, que podem inibir a produção de radicais livres pela quebração de metais catalisadores do stress oxidativo, redução das concentrações de espécies oxigênio reativas e pela desoxidação de radicais iniciadores. As enzimas superóxido dismutase Manganês e superóxido dismutase cobre e zinco, são consideradas agentes da primeira linha de defesa antioxidante contra os radicais livres, removendo o superóxido e o peróxido de hidrogênio (Aruoma, 1996; Nagler *et al.*, 2000). A catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e em oxigênio. Porém, a remoção mais importante de peróxido de hidrogênio é dada pela enzima glutatona peroxidase, que age na presença do selênio (Aruoma, 1996).

O selênio é um mineral essencial para o organismo e possui propriedade antioxidante (Gøenback *et al.*, 1995; Bezlepkin *et al.*, 1996; Bronzetti *et al.*, 2001; Dellibasi *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2003), mas seu mecanismo de ação não é claro e ainda é objeto de estudo (Dellibasi *et al.*, 2002). Acredita-se que seja por meio da sua ligação covalente a proteínas, formando as selenoproteínas, destacando-se a glutathiona peroxidase (Gøenback *et al.*, 1995; Aruoma, 1996; Rafferty *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 1999; Dellibasi *et al.*, 2002; Rafferty *et al.*, 2003) e a thioredoxina redutase, que possuem propriedades antioxidantes similares (Rafferty *et al.*, 1998; Rafferty *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2003). Rafferty *et al.* (1998) e Bronzetti *et al.* (2001) afirmaram que os componentes de selênio inorgânicos, como o selenito de sódio, são antioxidantes mais efetivos.

Portanto, vêm-se comprovando a ação radioprotetora do selenito de sódio no aumento da sobrevivência de animais (Weiss *et al.*, 1992), de cultura de células (Yan & Spallholz, 1993; Rafferty *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 1999), no processo de reparação tecidual de feridas de ratos (Tuji, 2001), no intestino de ratos (Mutlu-Turkoglu *et al.*, 2000) e por fim, nas glândulas salivares parótidas de ratos (Tuji, 2004).

Neste estudo, o selenito de sódio administrado 24 horas antes da irradiação, atenuou os efeitos da radiação em todos os tempos estudados em ambas células secretoras, mas não impediu que o grupo selenito de sódio/irradiado sofresse alterações semelhantes ao grupo irradiado, diferindo deste no primeiro tempo apenas pelo maior número de grânulos de secreção íntegros. Já nos tempos seguintes, houve diferenças evidentes, nos quais o grupo selenito de sódio/irradiado apresentou maior integridade e organização tecidual progressiva que o grupo irradiado. Diante dessas observações, sugere-se que o selenito de sódio deva ter promovido inicialmente uma maior integridade dos

grânulos de secreção, impedindo que estes se infiltrassem no citoplasma celular com conseqüente lise de organelas e autólise, encontrados com maior freqüência no grupo irradiado. A radioproteção do selenito de sódio nestas mesmas condições de administração, também foi observada por Tuji em 2001 na reparação tecidual de feridas irradiadas e, posteriormente em 2004, nas células serosas de glândulas parótidas de ratos, sendo que nestas últimas as células passaram a apresentar menor destruição a partir das 12 horas.

Wilson *et al.* (1997) relataram que os componentes inorgânicos de selênio, como o selenito de sódio, são menos tóxicos que as formas orgânicas, como a seleniometionina, discordando de Rafferty *et al.*, (1998), Bronzetti *et al.*, (2001), Stewart *et al.* (1999). Apesar de possuir ação antioxidante o selênio, em excesso, possui atividade tóxica demonstrada por estudos em culturas de células (Yan & Spallholz 1993; Rafferty *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 1999; Bronzetti *et al.*, (2001) e “*in vivo*” (Gøenback *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1997; Dellibasi *et al.*, 2002). Sua toxicidade caracteriza-se pela promoção de lesões oxidativas no DNA (Lu *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1999;), morte celular (Bronzetti *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 1999), inibição da proliferação celular (Gøenback *et al.* 1995; Lu *et al.*, 1994) e de alterações morfológicas (Dellibasi *et al.*, 2002) e ultra-estruturais (Tuji, 2004). Segundo Weitberg *et al.*, (1985), Yan & Spallholz (1993), Rafferty *et al.* (1998) e Stewart *et al.* (1999), a citotoxicidade do selênio está associada à oxidação da glutatona e outros tióis, originando a selêniodiglutationa e glutatona seleniopersulfide, as quais promovem a formação de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Embora a dose de 0,5 mg/kg de peso corpóreo de selenito de sódio tenha promovido radioproteção neste estudo e nos trabalhos anteriores (Tuji, 2001; 2004), esta mesma dose no grupo selenito de sódio, causou processos degenerativos semelhantes ao grupo irradiado, diferindo do trabalho de Tuji (2001), que não encontrou alterações histomorfológicas no processo de reparação tecidual em feridas irradiadas de ratos. As alterações promovidas pelo

selenito de sódio foram observadas logo no primeiro tempo avaliado e em menor intensidade a partir do período de 12 horas da irradiação para as células mucosas e de 8 horas para as células serosas. Já no trabalho de Tuji (2004), as alterações foram evidentes a partir da oitava hora, com maior destruição nas 24 horas e diminuição a partir das 48 horas. Entretanto, vale ressaltar que no decorrer do experimento da presente pesquisa, nenhum animal tratado com selenito de sódio foi a óbito.

A presença da radiação ionizante acarreta no decréscimo do acúmulo de selênio por meio da quebra da sua ligação a proteínas, envolvendo a união dos grupos de enxofre (Nordman *et al.*, 1976). Além disso, a diminuição da concentração de Selênio pode ser também explicada por este, na célula, ser utilizado para diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio conseqüente da radiação ionizante, ao contrário do seu maior acúmulo no grupo selenito de sódio e resultante oxidação dos tióis. Desta forma, supõe-se que a diferença nos resultados entre o grupo selenito de sódio e o grupo selenito de sódio/irradiado, deva-se a mudanças no metabolismo das proteínas após a irradiação, acarretando no decréscimo do acúmulo de selênio que oxidaria os tióis.

Segundo Bohuslavizki *et al.* (1999), o radioprotetor ideal é aquele que proporciona proteção apenas nas células normais. De acordo com Nordman *et al.* (1976), a captação do selenito é cerca de 5 a 7 vezes maior nas lesões malignas que em tecido normal. Portanto, diante da dicotomia do selenito de sódio atuar como substância radioprotetora e, em maiores concentrações agir como substância tóxica, sugere-se estudos “*in vivo*” sobre a toxicidade do selenito de sódio em diversos órgãos, a fim de se encontrar doses que possam causar ao mesmo tempo, toxicidade nas células neoplásicas, acentuando os efeitos deletérios causados pela radiação e por fim, radioproteção das células normais.

7 CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais utilizadas, foi concluído que, apesar da toxicidade observada no grupo selenito de sódio, o selenito de sódio demonstrou ação radioprotetora nas células secretoras das glândulas submandibulares irradiadas.

REFERÊNCIAS

Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells on the differing radiosensitivity of gland. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.** 1984; 45 (4): 443-60.

Ahlner BH, Hagelqvist E, Lind MG. Influence on rabbit submandibular gland injury by stimulation or inhibition of gland function during irradiation- histology and morfometry after 15 gray. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 1994; 103 (2): 125-34.

Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radic Biol Med.** 1996; 20 (5): 675-705.

Bezlepkin, VG, Vasi'eva GV, Lumaeva MG, Sirota NP, Gaziev AI. The prolongation of survival in mice by dietary antioxidants depends on their age by the start of feeding this diet. **Mech Ageing Dev.** 1996; 92 (2-3): 227-34.

Bohuslavizki KH, Klutmann S, Jenicke L, Brenner W, Feyerabend B, Henze E *et al.* Radioprotection of salivary glands by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic (amifostine) obtained in a rabbit animal model. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 1999; 45 (1): 181-6.

Bronzetti G, Cini M, Andreoli E, Calvuturo L, Panunzio M, Croce C D. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. **Mutat Res.** 2001; 496 (1-2): 105-15.

Coppes RP, Vissink A, Konings AWT. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. **Radiother Oncol.** 2002; 63 (3): 321-8.

Coppes RP, Zeilstra LJW, Kampinga HH, Konings AWT. Early to late sparing of radiation damage to the parotid gland adrenergic and muscarinic receptor agonists. **Br J Cancer.** 2001; 85 (7): 1055-63.

Coppes RP, Zeilstra LJW, Vissink A, Konings AWT. Sialogogue-related radioprotection of salivary gland function: the degranulation concept revisited. **Radiat Res.** 1997; 148 (3): 240-7.

Delilbasi C, Demiralp S, Turan B. Effects of selenium on the structure of the mandible in experimental diabetics. **J Oral Sci.** 2002; 44 (2): 85-90.

Furuno I, Iwasaki T, Matsudaira H. Effects of X-irradiation on cell proliferation and DNA synthesis induced by administration of isoproterenol in salivary glands of the mouse. **Radiat Res.** 1974; 57 (3): 431-41.

Gøenback H, Frystyk J, Ørskov 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.

Henriksson R, Fröjd O, Gustafsson H, Johansson S, Yi-Qing C, Franzén L, Bjerner L. Increase in mast cells and hyaluronic acid correlates to radiation-induced damage and loss of serous acinar in salivary glands: the parotid and submandibular glands differ in radiation sensitivity. **Br J Cancer.** 1994; 69 (2): 320-6.

Kohn WG, Grossman E, Fox PC, Armando I, Goldstein DS, Baum BJ. Effect of radiation on sympathetic nerve function in parotid glands. **J Oral Pathol Med.** 1992; 21 (3): 134-7.

Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J Biophys Biochem Cytol.** 1961; 9:409-14.

Lu J, Kaek M, Jiang C, Wilson AC, Thompson H J. Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. **Biochem Pharmacol.** 1994; 47 (9): 1531-5.

Messelt EB, Dahl E. Influence of X-ray irradiation on the ultrastructure of rat submandibular gland striated-duct cells. **Acta Odontol Scand.** 1983; 41 (5); 277-82.

Mossman KL, Shatzman AR, Chenchardick JD. Effects of radiotherapy on human parotid saliva. **Radiat Res.** 1981; 88 (2): 403-12.

Mutlu-Turkoglu U, Erbil Y, Öztezcan S, Olguç V, Toker 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.

Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. A 2 week pair-fed study of early x-irradiation effects on rat major salivary gland function. **Arch Oral Biol.** 1996; 41 (7): 713-7.

Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Acute effects of irradiation on the function on rat salivary glands. **Radiat Res.** 1993a; 136 (1): 42-7.

Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Effects of irradiation on the function of rat salivary glands at 3 and 40 days. **Radiat Res.** 1993b; 136 (3): 392-6.

Nagler R M, Laufer D. Protection against irradiation-induced damage to salivary glands by adrenergic agonist administration. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 1998; 40 (2):477-81.

Nagler RM, Mammary Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M. Irradiation-induced damage to the salivary glands: the role of redox-active iron and copper. **Radiat Res.** 1997; 147 (4): 468-75.

Nagler RM, Reznick AZ, Slavin S, Nagler A. Partial protection of rat parotid glands from irradiation-induced hyposalivation by manganese superoxide dismutase. **Arch Oral Biol.** 2000; 45 (9): 741-7.

Norberg LE, Abok K, Lundquist P. Effects of ligation and irradiation on the submaxillary glands in rats. **Acta Otolaryngol.** 1988; 105 (1-2): 181-92.

Nordman E, Jászsági-Nagy E, Rekonen A. Changes in tumour cell selenite (⁷⁵ Se) affinity due to irradiation. **Ann Clin Res.** 1976; 8 (1) : 43-7.

Ó'Connell AC, Redman RS, Evans RL, Ambudkar IS. Radiation-induced progressive decrease in fluid secretion in rat submandibular glands is related to decreased acinar volume and not impaired calcium signaling. **Radiat Res.** 1999; 151 (2): 150-8.

Peter B, Van Waarde MAWH, Vissink A, s-Gravenmade E J, Konings AWT. The role of secretory granules in the radiosensitivity of rat salivary gland acini- a morphological study. **Radiat Res.** 1994; 140 (3): 419-28.

Pratt NE, Sodicoff M. Ultrastructural injury following X-irradiation of parotid gland acinar cells. **Arch Oral Biol.** 1972; 17 (8): 1177-86.

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 F, Arthur J R, Nicol F *et al.* Differential expression of selenoproteins by human skin and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. **Biochem J.** 1998; 332: 231-6.

Reade PC, Steidler NE. X- irradiation induced degranulation of cells of convoluted granular tubules of murine submandibular glands. **Biol Buccale.** 1985; 13 (4): 307-15.

Roesink JM, Konings AWT, Terhaard CHJ, Battermann JJ, Kampinga HH, Coppes RP. Preservation of the rat parotid gland function after radiation by prophylactic pilocarpina treatment: radiation dose dependency and compensatory mechanisms. **Int J Radiation Oncol Biol Phys.** 1999; 45 (2): 483-9.

Roslindo EB, Utrilla LS, Roslindo NC, Onofre MA. Estudo histomorfológico da glândula parótida de rato jovem, submetida à radiação ionizante. **Rev Odontol UNESP.** 1989; 18: 131-42.

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.

Sholley MM, Sodicoff M, Pratt NE. Early radiation injury in the rat parotid gland. **Lab Invest.** 1974; 31 (4): 340-54.

Sodicoff M, Conger AD, Pratt NE, Sinesi M, Trepper P. Chemoradioprotection of the rat parotid gland by combined use of WR-2721 and Ro-07-0582. **Radiat Res.** 1979; 82: 348-53.

Sodicoff M, Conger AD, Pratt NE, Trepper P. Radioprotection by WR-2721 against long-term chronic damage to the rat parotid gland. **Radiat Res.** 1978; 76 (1): 172-9.

Sodicoff M, Conger AD. Radioprotection of the rat parotid gland by WR-2721 and isoproterenol and its modification by propranolol. **Radiat Res.** 1983a; 94 (1): 97-104.

Sodicoff M, Conger AD. Radioprotection of the rat parotid gland by cAMP. **Radiat Res.** 1983b; 96 (1): 90-4.

Stephens LC, Schultheiss TE, Small SM, Ang KK, Peters LI. Response of parotid gland organ culture to radiation. **Radiat Res.** 1989; 120 (1): 140-53.

Stern MH, Turner JE, Jett LS, Mincer H, McGinnis JP. Electron microscopic changes in rat parotid and submandibular glands subsequent to total body irradiation with fast neutrons. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1976; 42 (5): 620-30.

Stewart MS, Spaallholz 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.

Tuji FM. **Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual- Estudo experimental em ratos.** Piracicaba [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2001.

Tuji FM. **Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas parótidas de ratos** [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.

Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Ligeon EE, Konings AWT. A functional and chemical study of radiation effects on parotid and submandibular/sublingual glands. **Radiat Res.** 1990; 124 (3): 259-65.

Vissink A, Kalicharan D, 's-Gravenmade EJ, Jongebloed WL, Ligeon EE, Nieuwenhuis P *et al.* Acute irradiation effects on morphology and function of rat submandibular glands. **J Oral Pathol Med.** 1991a; 20 (9): 449-56.

Vissink A, s`-Gravenmade EJ, Ligeonne E, Konings AWT. Effects of splint-dose X irradiation on rat salivary gland function. **Radiat Res.** 1991b; 127 (1): 52-7.

Weiss JF, Srinivasan V, Kumar KS, Landauer MR. Radioprotection by metals: selenium. **Adv Space Res.** 1992; 12 (2-3): 223-31.

Weitberg AB, Weitzman SA, Clarck EP, Stossel TP. Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. **J Clin Invest.** 1985; 75 (6): 1835-41.

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 J E. 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

 UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEA-IB-UNICAMP
--	--	--

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

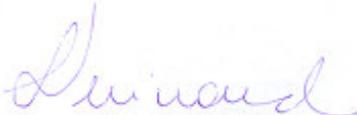
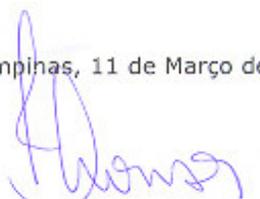
C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 640-1, sobre "**EFEITO RADIOPROTETOR DO SELENITO DE SÓDIO EM GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES DE RATOS**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Silvana Pereira de Barros/Maria Luiza dos Anjos Pontual** 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 11 de Março de 2004.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 640-1, entitled "**RADIOPROTECTOR EFFECT OF THE SODIUM SELENITE IN SUBMANDIBULAR GLANDS OF 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 march 11, 2004.

Campinas, 11 de Março de 2004.

 _____ Profa. Dra. Liana Verinaud Presidente - CEEA/IB/UNICAMP	 _____ Fátima Alonso Secretária - CEEA/IB/UNICAMP
--	--

<small>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL</small>	<small>TELEFONE 55 19 3788-6359 FAX 55 19 32893124</small>
---	--