

Amanda Maria Medeiros de Araujo

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA
VITAMINA E NA TAXA DE ERUPÇÃO DENTAL EM
RATOS IRRADIADOS**

Piracicaba
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

AMANDA MARIA MEDEIROS DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DA VITAMINA
E NA TAXA DE ERUPÇÃO DENTÁRIA EM RATOS
IRRADIADOS**

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE DOUTORA EM RADIOLOGIA
ODONTOLÓGICA NA ÁREA DE RADIOLOGIA
ODONTOLÓGICA.

Este exemplar corresponde à versão final da
Tese defendida pela aluna Amanda Maria
Medeiros de Araujo e orientada pelo Prof. Dr.
Pedro Duarte Novaes.

Assinatura do Orientador

Piracicaba, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Ar15a Araujo, Amanda Maria Medeiros de, 1984-
Avaliação do efeito radioprotetor da Vitamina E na taxa de
erupção dentária em ratos irradiados / Amanda Maria Medeiros
de Araujo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Pedro Duarte Novaes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Radiação ionizante. I. Novaes, Pedro Duarte,
1960- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of radioprotective effect of vitamin e on rate of
tooth eruption in irradiated rats

Palavras-chave em Inglês:

Ionizing radiation

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutora em Radiologia Odontológica

Banca examinadora:

Pedro Duarte Novaes [Orientador]

Nádia Fayez Omar

Juliana dos Santos Neves

Maria Luiza dos Anjos Pontual

Deborah Queiroz de Freitas França

Data da defesa: 18-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Radiologia Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata AMANDA MARIA MEDEIROS DE ARAUJO aprovada.

Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

Profa. Dra. NÁDIA FAYEZ OMAR

Profa. Dra. JULIANA DOS SANTOS NEVES

Profa. Dra. MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL

Profa. Dra. DEBORAH QUEIROZ DE FREITAS FRANÇA

*À minha família, meus amados:
pais **Oswaldo e Neta**
e irmãos **Aline e Alisson**,
dedico este trabalho!!!*

Agradecimento Especial

Ao meu querido professorzinho do coração... ♥ Meu estimado orientador, exemplo de vida, que me permitiu construir uma história acadêmica ao seu lado. Professor Pedro, o senhor sabe o quanto te admiro e respeito. Muito obrigada pela confiança e carinho!!!

Agradecimentos aos Professores

*Ao professor Dr. **Pedro Duarte Novaes** pelo carinho, atenção, sinceridade, receptividade, confiança em mim depositada, enfim, por ser uma pessoa tão importante na minha vida!!! Foi uma honra ter sido sua orientada!*

*À professora Dra. **Maria Luiza dos Anjos Pontual**, mais do que uma eterna orientadora, uma querida amiga que serviu de inspiração para o meu futuro.*

*À professora Dra. **Solange Maria de Almeida** por me receber com carinho e estar disponível em importantes momentos que tanto precisei. Muito obrigada!*

*Ao professor Dr. **Fraib Norberto Bóscolo** pelo carinho, atenção e disponibilidade dispensadas, me ensinando com a sua experiência. Eu não estaria hoje aonde cheguei sem sua ajuda!!!*

*Ao professor Dr. **Francisco Haiter Neto** pela inestimável oportunidade de trabalhar juntos. Seus conhecimentos me ajudaram a crescer mais e mais a cada dia.*

*À Professora Dra. **Gláucia Maria Bovi Ambrosano**, pela sua dedicação e competência para realizar as análises estatísticas. Obrigada por estar à nossa disposição mesmo sempre muito ocupada!*

*Ao Professor Dr. **Marcelo Rocha Marques**, pela sua constante ajuda, sorrisos e disponibilidade em vários momentos em Piracicaba.*

*À Professora Dra. **Deborah Queiroz de Freitas** pelo carinho, atenção e simpatia em todos os momentos.*

Agradecimentos Especiais

À Deus que sempre esteve me vigiando e protegendo. Obrigada Senhor por sempre me ouvir e acalmar. E a Nossa Senhora Mãe de Deus por me escutar e atender em momentos tão valiosos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela incrível oportunidade de crescimento tanto pessoal quanto profissional.

*Aos meus queridos pais, **Painho e Mainha (Osvaldo e Neta)**, pelo amor, carinho e apoio durante estes anos que fiquei longe de casa. Apesar de a saudade apertar e de momentos difíceis surgirem, vocês sempre estavam ao meu lado, para me guiar, ajudar e incentivar. Amo muito vocês!!!*

*À minha tia avó, **Beza**, por todo o amor e carinho. Amo você!*

*Aos meus amados irmãos, **Aline e Alisson**, por suportarem as dificuldades na minha ausência, por me amarem e me apoiarem em todos os momentos que necessitei. E é claro, ao meu querido cunhado **Ranieri**, pelo carinho e confiança.*

*Ao meu amado **Jonas** por me ajudar, escutar, incentivar e amar. Sua ajuda foi essencial para esta conquista. Obrigada!*

*À maravilhosa e fiel amiga, **Julianna Joanna**, que sempre me ajudou, apoiou e escutou tanto nos bons quanto nos maus momentos em Piracicaba. Seu suporte e amizade permitiram que eu chegasse até aqui. Obrigada!*

*Aos queridos amigos do “doutorado velho”, **Daniela, Matheus, Luciana e Carolina**, que mais do que instrutores, se tornaram grandes amigos que tenho certeza sempre poder contar.*

*Aos amigos do Doutorado e antigo Mestrado, **Monikelly, Débora Távora, Maria Beatriz, Laura, Frederico, Luana, Isabela, Manuela e Carla Klamt** que transformaram a estadia em Piracicaba, mais do que uma fase, uma vida em família. Vocês fazem parte de momentos maravilhosos da minha vida.*

*À **Luciane**, que ajuda é uma palavra pequena comparada ao apoio que me deu. Sua atenção, carinho e simpatia são características marcantes, te admiro demais. Muito obrigada!*

*À **Waldeck, Fernando e Giselda**, pela incrível colaboração e aprendizado que tive na Clínica de Radiologia. Momentos maravilhosos e inesquecíveis juntos...*

*À **Li, Cidinha, Gustavo, Nádia, Zé e Juliana**, pelo carinho, atenção, amizade e tantos momentos de risadas. Muito obrigada!*

*Às minhas queridas e eternas amigas, **Adriana, Fernanda, Laíza, Camilla e Juliana**, que sempre torceram e acreditaram em minha vitória.*

*Agradecimento especial à **Carolzinha e Carlota** que me ajudaram em momentos essenciais no desenvolvimento desta pesquisa, como segurando os animais, fazendo medidas e até mesmo limpando as caixas. Obrigada!*

*À Professora **Dra. Flávia Maria**, pelos conselhos e orientações, prestando valiosas informações para a realização desta pesquisa.*

*Ao **Hospital dos Fornecedoros de Cana de Piracicaba**, pela oportunidade da realização da pesquisa.*

*Aos funcionários do Biotério, **Fábio, Wanderley e Flor**, que trataram tão bem dos meus queridos ratinhos.*

*A todos os **parentes e amigos** que estiveram sempre disponíveis quando precisei... E que sempre aceitaram os atrasos com um sorriso no rosto.*

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

*“O mundo está nas mãos daqueles
que têm a coragem de sonhar e
de correr o risco de viver seus sonhos”
Paulo Coelho*

RESUMO

O objetivo neste trabalho foi avaliar, por meio de análise histológica e taxa de erupção dentária, o efeito radioprotetor da vitamina E na região odontogênica de incisivos de ratos. Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Albinus Wistar), os quais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle (C), radioterapia (R), radioterapia + óleo de oliva (RO) e radioterapia + óleo de oliva + vitamina E (ROV), nos quais os animais dos grupos experimentais receberam doses únicas de 15 Gy de radioterapia por raios X na região de cabeça e pescoço. A taxa de erupção dentária foi medida em todos os animais durante 14 dias e os resultados avaliados estatisticamente utilizando o procedimento PROC MIXED ($p \leq 0,05$). Os ratos submetidos à radioterapia apresentaram queimaduras, alopecia e perda de peso no dia do sacrifício. Constatou-se diminuição da taxa de erupção dentária dos grupos experimentais R e RO a partir do sexto dia após a radioterapia em relação ao grupo controle. A partir do décimo dia após a radioterapia ocorreu diminuição na taxa de erupção dentária de todos os ratos experimentais em relação ao controle. No início da região odontogênica dos grupos que foram submetidos à radiação, observou-se uma aparente redução na população celular da região do folículo adjacente à face lingual do órgão dentário, quando comparado ao grupo controle e alterações na formação da alça epitelial independente do tratamento aplicado. Na região odontogênica correspondente à face distal do terceiro molar, foi possível identificar intensa destruição com visível redução no tamanho do órgão dentário provocada pela falta de produção de esmalte e dentina, presença de um grande vaso e hemorragia. Dentro das condições experimentais utilizadas, concluiu-se que, apesar de histologicamente não haver evidência de proteção, a vitamina E demonstrou leve ação radioprotetora na taxa de erupção dentária em ratos.

Palavras Chave: Radiação ionizante, Radioprotetores, Vitamina E.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate, by means of histology and rate of tooth eruption, the radioprotective effect of vitamin E in odontogenic region of rat incisors. A total of 40 male rats (*Rattus norvegicus*, Albinus Wistar), which were randomly divided into four groups: control (C), radiotherapy (R), radiation + olive oil (RO) and radiotherapy + olive oil + vitamin E (ROV), in which the animals of the experimental groups received single doses of 15 Gy of X-ray radiation in the head and neck. The rate of tooth eruption was measured in all animals for 14 days and the results statistically analyzed using PROC MIXED ($p \leq 0.05$). Rats treated with radiotherapy had burns, alopecia and weight loss on the day of sacrifice. Observed a decrease in the rate of tooth eruption of the experimental groups R and RO from the sixth day after radiotherapy compared to the control group. From the tenth day after radiotherapy occurred decrease in the rate of tooth eruption of all experimental rats compared to control. In the beginning of odontogenic region in the groups that underwent radiation, there was an apparent reduction in the cell population of the region adjacent to the follicle lingual dental organ when compared to the control group and changes in the formation of epithelial handle regardless of the treatment applied these. In odontogenic region corresponding to the distal face of the third molar, was identified with intense destruction visible reduction in organ size caused by lack of dental enamel and dentin production, presence of a large vessel and bleeding. Within the experimental conditions used, it was concluded that histologically there was no evidence protection, vitamin E showed mild radioprotective effect on the rate of tooth eruption in rats.

Keywords: Ionizing radiation, Radiation-protective agents, Vitamin E.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
3. PROPOSIÇÃO	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO	67

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a incidência dos tumores em crianças no mundo varie de 1% a 3% do total de casos de câncer. O percentual mediano dos tumores pediátricos no Brasil encontra-se próximo de 3%. Como, para o Brasil, em 2012, à exceção dos tumores da pele não melanoma, estimam-se 384.340 casos novos de câncer, depreende-se, portanto, que ocorrerão cerca de 11.530 casos novos de câncer em crianças e adolescentes até os 19 anos (Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil, 2011).

Várias modalidades de terapias têm sido aplicadas em crianças portadoras de câncer, as quais estão associadas a efeitos tóxicos resultando em complicações a curto e longo prazo (Jham *et al.*, 2008; Kaste *et al.*, 2009; Lôbo & Martins, 2009). A radioterapia combinada com a cirurgia tem sido a principal modalidade de tratamento para neoplasias de cabeça e pescoço. Segundo Otmani (2007), esse tratamento combinado tem alcançado altos índices de cura e aumento da sobrevida dos indivíduos acometidos.

Como a região de cabeça e pescoço é uma área complexa composta por diversas estruturas desiguais que respondem de formas diferentes à radiação, existe uma preocupação devido à alta porcentagem de complicações orais que podem ocorrer durante e/ou após o tratamento radioterápico sendo dividida em aguda e tardia (Hong *et al.*, 2010).

A radioterapia em câncer de cabeça e pescoço tem sua aplicabilidade e eficácia em função de parâmetros como o tipo histológico da neoplasia, do local e volume da área a ser irradiada, dose, ritmo de aplicação, tipo de radiação e condições gerais do paciente (Cardoso *et al.*, 2005; Rosales *et al.*, 2009).

Segundo Albuquerque *et al.* (2007) e Lopes *et al.* (2006), as complicações bucais mais frequentes a pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço e/ou quimioterapia são hemorragia, infecção, exacerbação de infecção preexistente, mucosite, xerostomia, cárie de radiação e alterações na odontogênese. Dentre as alterações na odontogênese podem ocorrer hipoplasia de esmalte, parada de desenvolvimento do órgão dentário, não formação de dentes, microdontia e alterações na rizogênese, tais como interrupção, afilamento e alargamento da câmara pulpar. Existem estudos sobre o efeito da

radiação em dentes permanentes, sendo que o grau de severidade das lesões depende do estágio de formação dentária, bem como da dose e da extensão da área irradiada (Kaste *et al.*, 1994; Campos, 2004; Lopes *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2007; Otmani, 2007).

A dentição decídua inicia sua formação entre a sexta e oitava semana de vida embrionária, enquanto os dentes permanentes iniciam entre a vigésima semana intra-uterina e o décimo mês pós-natal, exceto os terceiros molares, que têm a sua formação até o quinto ano de vida. O desenvolvimento dos dentes dura aproximadamente dezesseis anos para ser completado, sendo um processo muito complexo podendo sofrer várias alterações durante esse período de formação (Ten Cate, 2001; Lesot & Brook, 2009).

Os efeitos da radiação ionizante são mediados principalmente pelos radicais livres de oxigênio que são gerados pela ação da radiação sobre as moléculas de água presentes nos tecidos. Esses radicais altamente oxidantes removem átomos de hidrogênio de ácidos graxos, causando a peroxidação lipídica com consequentes alterações na permeabilidade e fluidez das membranas, e em última instância, com a morte das células. Os oxiradicais também induzem quebra na fita de DNA e oxidação protéica (Andrews & Griffiths 2001a, 2001b). Existe uma preocupação da equipe multidisciplinar em manter a melhor qualidade de vida do paciente durante e após o tratamento radioterápico, prevenindo sequelas que possam ocorrer.

Algumas substâncias podem diminuir a ação dos radicais livres formados pela radioterapia, sendo denominadas de substâncias radioprotetoras. A vitamina E é encontrada em óleos vegetais (amendoim, soja, palma, milho, girassol, etc.), nozes, folhas verdes, sementes e grãos inteiros, bem como existem também suplementos que fornecem vitamina E ao organismo, onde nenhum apresenta efeitos colaterais dose-dependente (Brigelius-Flohé & Traber, 1999; Himmelfarb *et al.*, 2003; Wu & Corft, 2007; Lemaire-Ewing *et al.*, 2010). É uma substância responsável por efeitos contra a deterioração das células e contra o envelhecimento do organismo, além de suas funções antioxidantes, a vitamina E é conhecida por ser parcialmente responsável pela regeneração de todos os tecidos do corpo, incluindo sangue, pele, ossos, músculos e nervos (Prasad *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2007; Engin, 2009; Birringer, 2010).

A vitamina E tornou-se uma substância no estudo da possível ação protetora contra os efeitos adversos da radiação ionizante. Como não foram encontrados trabalhos sobre a ação desta vitamina na taxa de erupção dentária bem como seus efeitos na odontogênese, realizou-se esta pesquisa com a intenção de melhorar a qualidade de vida de pacientes submetidos à radioterapia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Atuação da radioterapia

A radioterapia ocupa um lugar importante no tratamento dos carcinomas da região de cabeça e pescoço e destrói tanto células tumorais como normais (Lôbo & Martins, 2009). A radiação leva a danos celulares através da indução da formação de radicais livres. Efeitos determinísticos causados pela radiação agem em tecidos diferenciados que apresentam menor grau de recuperação quando seriamente danificados. Entretanto, esses efeitos requerem doses maiores para causar dano sério à saúde (Langland & Langlais, 2002).

A ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, utilizadas isoladamente ou em combinação, são as três mais comuns modalidades utilizadas no tratamento do câncer de cabeça e pescoço. Embora sejam eficazes na erradicação do tumor, também causam prejuízos aos tecidos adjacentes (Hong *et al.*, 2010). Os prejuízos diretos para as estruturas orais frequentemente ocorrem a partir da radioterapia e quimioterapia e os danos indiretos podem também surgir a partir da toxicidade sistêmica. Essas complicações podem ocorrer durante e/ou após o tratamento contra o câncer (Jham *et al.*, 2008).

Rosales *et al.* (2009) ressaltaram que apesar das vantagens reconhecidas no tratamento de tumores malignos, a terapia de radiação tem vários efeitos secundários na região da cabeça e pescoço e que a avaliação das condições orais por um cirurgião-dentista é importante para prevenir ou minimizar esses problemas.

O tratamento radioterápico leva a anormalidades do desenvolvimento craniofacial, como hipodesenvolvimento maxilar e/ou mandibular e formação de estruturas anômalas mineralizadas. Tanto a quimioterapia quanto a radioterapia podem causar alterações na odontogênese como hipoplasia de esmalte, coroas pequenas, anodontia, microodontia; alterações na rizogênese, tais como fechamento prematuro dos ápices, afilamento, taurodontia, efeitos esses mais acentuados quando as duas formas terapêuticas estão associadas (Campos, 2004; Albuquerque *et al.*, 2007; Otmani, 2007). Os distúrbios

mais graves na odontogênese são vistos quando a exposição à radiação ocorre no início da formação e nas fases de diferenciação celular. A radioterapia também tem efeito direto sobre os odontoblastos, diminuindo a capacidade de produção de dentina reacional, dependendo da dose e da idade do paciente (Otmani, 2007).

De acordo com Andrews & Griffiths (2001a), a radioterapia para tumores de cabeça e pescoço é uma modalidade de tratamento viável que pode gerar uma vasta gama de complicações dentárias potencialmente debilitantes. Dentes irradiados podem apresentar uma descalcificação dentária com maior facilidade, os mecanismos de secreção dos odontoblastos podem ser afetados observando a formação de osteodentina, redução de vascularização com fibrose e atrofia; e, atuando nos estágios de desenvolvimentos dentários podem alterar o crescimento dentário e resultar em irregularidades na dentina e no esmalte.

Em 1951, English & Tullis observaram efeitos patológicos nos tecidos orais, glândulas salivares e desenvolvimento dentário de suínos jovens. Radiação foi aplicada no corpo todo com doses de 250 a 800 R e dentes e maxilares foram coletados para análise histológica. Alterações grosseiras foram visualizadas na mucosa oral como hemorragia e ulcerações. Glândulas salivares se mostraram os tecidos menos sensíveis à radiação, no que diz respeito a alterações histológicas. Um tipo característico de hipoplasia no esmalte foi observado em molares que receberam doses acima de 400 R, logo ameloblastos produzindo ativamente matriz orgânica do esmalte parecem ser sensíveis à radiação.

Dale (1953) estudou o efeito histopatológico da irradiação no incisivo de ratos. Os animais foram divididos de acordo com a idade e a dose de exposição (controle, 375, 500, 625 e 750 rad) e sacrificados 30 dias após a radiação. Observou-se que morreram mais ratos nos grupos que foram expostos a uma dose maior de radiação, bem como a amelogênese e dentinogênese foram progressivamente inibidas e o grau de hipoplasia aumentaram. O esmalte e dentina pré-expostos e o esmalte e dentina hipoplásicos pós-irradiação são facilmente visíveis, observando que a radiação causa alterações na formação do órgão dentário.

English *et al.* (1954) avaliaram o efeito da radiação ionizante na cavidade bucal. Ratos foram expostos a 500, 1000 e 1500 rad na região de cabeça e pescoço e divididos de acordo com a etapa do estudo e sacrificados após 100 dias. No grupo 500 e 1000 rad,

alterações dentárias não foram observadas. No grupo 1500 rad, foi observada perda de pêlo, lesões na pele, alterações oculares e de peso, bem como dentais. Microscopicamente observou-se uma ruptura completa no dente antes e após a radiação. Muitas vezes havia uma cavidade pulpar grande na parte antes da exposição, indicando que odontoblastos foram destruídos. A área entre o segmento pré-radioterapia e pós-radioterapia do dente foi cercado por polimorfonucleares, com uma área central de necrose. Uma reação inflamatória foi bem evidente ao longo da porção neoformada do dente e grandes massas de cimento estavam presentes. Na dentina, havia geralmente uma zona em que praticamente não estava presente. Constatou-se que não parecia haver uma recuperação total dos tecidos do dente formado.

Utilizando 100 ratos, Hansen e English (1957) aplicaram uma radioterapia de 1500 R na região de cabeça e pescoço em metade destes animais com a finalidade de identificar o período de sobrevida e crescimento dos incisivos em 16, 24, 39, 48 horas e 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 16 e 21 dias após exposição. No dia seguinte, 18 animais dos 50 que foram submetidos à radioterapia morreram decorrente de seus efeitos colaterais, outros dois ratos morreram 9 dias após. No período de 16 e 24 horas após a radioterapia, não foi possível observar nenhuma alteração dos animais experimentais em relação ao controle. Na avaliação histológica de 5 dias após a radioterapia observou-se alteração visível na amelogênese e odontogênese, também visível em sete dias, entretanto foi possível identificar uma neoformação na porção apical do epitélio odontogênico. No oitavo dia, observou-se uma proliferação e diferenciação celular, e no nono dia ficou visível uma regeneração dos tecidos dentários, sendo visível a separação de um segmento pré-radioterapia e outro pós-radioterapia. Esta separação continuou em 16 e 21 dias sendo que no último verificou-se uma maior estabilização apesar de apresentar algumas irregularidades. Os autores concluíram que alterações severas aconteceram nos tecidos odontogênicos na dose estudada.

Coady *et al.*, em 1967, estudaram os efeitos da radiação gama sobre a taxa de erupção dentária em ratos. Animais foram submetidos a radiação no corpo inteiro com dose cumulativa de 1200 e 2400 rad. Os incisivos superiores foram marcados logo abaixo na margem gengival com uma ponta diamantada em uma peça de mão e sacrificados uma

semana após. Não foi observado diferença estatística entre os grupos em relação a taxa de erupção. Não foram observados efeitos sobre a taxa de renovação celular e alterações histológicas nos incisivos, todavia, vários efeitos secundários foram observados no final do incisivo.

Koppang e Stokke, 1969, avaliaram se havia diferença entre os incisivos superiores e inferiores de ratos submetidos à radioterapia, com relação à sua sensibilidade. Foram usados 60 animais aleatoriamente divididos em seis grupos de acordo com a dose de radiação X recebida: 7, 6, 5, 4, 3 e 2 Gy. A radiação foi direcionada lateralmente à cabeça dos animais, de modo a permitir que ambos os dentes fossem atingidos de maneira semelhante. O tempo de sacrifício foi de 14 dias. Foi possível observar que a dose mínima utilizada (2 Gy) foi capaz de induzir a formação de lesões completas e incompletas na face vestibular dos incisivos superiores, enquanto que a dose de 7 Gy induziu a formação de alterações na face lingual dos incisivos superiores e inferiores. Os autores puderam concluir que a face vestibular apresenta maior radiosensibilidade do que a lingual e que o incisivo superior é considerado o dente mais radiosensível.

Em 1975, Horn *et al.* compararam os efeitos de doses fracionadas e únicas de radiação X no incisivo de ratos. Foram divididos de acordo com a dose administrada: controle, dose única de 1500 R, 3 doses totalizando 2400 R, 5 doses totalizando 2690 R. Foi possível observar radiograficamente que o incisivo superior foi afetado em todos os períodos experimentais. Nos ratos que receberam doses fracionadas foi visualizada uma interrupção na formação dental entre o terço basal e médio, nos que receberam dose única a interrupção aconteceu com renovação e formação dentária. As áreas de interrupção nos grupos com doses fracionadas mostravam interrupção na aposição de dentina, lacunas de reabsorção, necrose e desaparecimento do germe dentário. No grupo de dose única de 1500 R ocorreu formação de barreira calcificada no local da interrupção, diferenciação dos ameloblastos e odontoblastos em áreas isoladas e tecido odontogênico da área basal semelhante ao normal. Concluiu-se que doses únicas de raios X são menos prejudiciais que doses fracionadas.

Sweeney *et al.* (1977) avaliaram o efeito da radiação sobre os dentes de ratos albinos em desenvolvimento. Os animais foram divididos em grupo controle, 2400, 4800 e

7200 rad. Foram realizadas avaliação microscópica e comparação entre os grupos, constatando que o grupo 2400 rad apresentou semelhanças com o controle. No grupo 4800 rad alterações patológicas foram encontradas de forma mais severa nas primeiras semanas pós-irradiação e que ocorreram apenas na região odontogênica no dente incisivo, tais como formação irregular de dentina, células odontoblásticas desorganizadas, entretanto o esmalte não apresentou alterações. O grupo 7200 rad foi o grupo com mais alterações severas nos odontoblastos e nos ameloblastos. Constatou-se que em doses mais altas de radiação os efeitos histológicos se tornam mais evidentes e que os ameloblastos são células menos sensíveis a radiação do que os odontoblastos.

Kahn *et al.*, em 1979, estudaram alterações nos germes dos molares de ratos pelos efeitos da radiação X. Utilizaram ratas grávidas que tiveram seus fetos removidos com 18 dias de gestação e o germe do primeiro molar extraído. Utilizando uma dose de 16 Gy de radiação X no segundo dia da cultura *in vitro* os germes foram avaliados por 12 dias e encontradas alterações que dependeram do tempo de sacrifício pós-irradiação. Os autores constataram dez dias após a radioterapia alteração nas cúspides, destruição grave dos ameloblastos com falta de produção de esmalte, nos odontoblastos e alterações na dentina, bem como pré-ameloblastos e pré-odontoblastos apresentando degeneração moderada.

Avaliando os efeitos da irradiação gama de corpo todo com doses de 8 a 16 Gy em dentes de ratos, Pearson & Phelps (1981), observaram morte dos animais 20 semanas após a irradiação. Sete semanas após a radioterapia os grupos que receberam 12, 14 e 16 Gy apresentaram ausência dentária em vários animais, provavelmente devido à redução significativa da taxa de erupção. Os autores afirmam ainda que a região odontogênica, devido a sua alta taxa de divisão celular, é altamente radiosensível.

Em 1989, Lee *et al.* observaram hipodontia em pré-molares após irradiação em cachorros Beagle. Os animais foram divididos em seis grupos baseado no momento de radioterapia: intra-uterino (8, 28 e 55 dias pós-coito) e pós-parto (2, 70 e 365 dias pós-parto) e conforme a dose de radiação: controle; 0,16; 0,83; 1; 1,2; 1,8; 2,1; 2,2; 2,6; 2,9; 3,4 e 3,8 Gy. Verificou-se que havia relação entre dose e tempo na observação de hipodontia de pré-molares nos animais irradiados 55 dias pós-coito e 2 dias pós-parto com doses iguais ou

maiores a 0,83 Gy; e também nos animais irradiados 28 dias pós-coito com doses iguais ou maiores a 1,2 Gy.

Saad *et al.*, em 1991, verificaram alterações no desenvolvimento pré-natal de incisivos de ratos pela radiação gama. As ratas grávidas foram expostas a 4 Gy de radiação gama com 12 dias de gestação. Atraso no desenvolvimento dos incisivos superiores e inferiores dos animais irradiados, ausência da matriz de dentina, papila pobremente estabelecida, áreas de necrose, células do epitélio interno do órgão do esmalte pobremente diferenciadas e falha na polarização foram visualizados. Concluíram que a radiação gama interfere na citodiferenciação do órgão do esmalte e papila dentária com inibição da odontogênese.

Ubios *et al.*, em 1992, avaliaram o crescimento mandibular e a taxa de erupção dentária em molares de ratos submetidos a radiação X na região de molares. Os grupos foram subdivididos em controle e irradiados (20 Gy), com tempos de sacrifício de 30 e 60 dias. Foi possível observar que os animais irradiados apresentavam atrofia muscular e micrognatia, além de atraso ou falha na erupção dos molares inferiores. A diminuição da taxa de erupção foi significativa nos tempos de sacrifícios utilizados.

Kaste *et al.* (1994) estudaram alterações dentárias em crianças com doenças malignas submetidas à quimioterapia e radioterapia. Anormalidades foram observadas em radiografias panorâmicas obtidas antes, durante e após o tratamento. Foram encontradas anormalidades na odontogênese induzida por quimioterapia como nanismo radicular, hipodontia, microdontia e taurodontia. Efeitos da radioterapia incluíram dentes ou raízes reduzidas, hipodontia e alteração na erupção dentária. Muitas crianças receberam os dois tipos de tratamento e, distinguir os efeitos da quimioterapia daquelas causadas pela radiação foi difícil. Concluíram que a natureza e gravidade dos efeitos colaterais variam de acordo com a idade da criança, doses e região anatômica tratada.

Kaste *et al.* (1997) definiram alterações dentais em pacientes sobreviventes de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Reviram registros clínicos e radiografias panorâmicas de sobreviventes entre 1975 e 1991. Foram comparados pacientes com idade até 8 anos idade e maiores de 8 anos, que receberam doses de 1800 cGy com baixo risco ou 2400 cGy de alto risco. As anormalidades encontradas foram: raiz atrofiada (24,4%), microdontia

(18,9%), hipodontia (8,5%), taurodontia (5,9%) e dentes retidos (4,0%). Os pacientes que possuíam até 8 anos e receberam radioterapia desenvolveram mais anormalidades dentárias mais do que os maiores de 8 anos e os que não receberam irradiação. Constataram que sobreviventes de LLA apresentam frequentemente anomalias dentais que podem afetar sua qualidade de vida.

Manzi, 2005, avaliou o efeito da radiação X no desenvolvimento dentário de primeiros molares de fetos de ratos. Foram irradiados com doses de 1 e 4 Gy *in utero* aos 13 dias de gestação (estágio de lâmina), 16 dias (estágio de broto) e aos 19 dias (estágio de sino). Os animais foram sacrificados 30 dias após o nascimento e alterações foram avaliadas quantitativa e qualitativamente por meio da microscopia eletrônica de varredura. Foi possível observar que a radiação X promoveu efeito deletério nas dimensões oclusais dos molares em desenvolvimento, em todos os estágios estudados com a dose de 4 Gy, principalmente no estágio de sino, os quais apresentaram fusão das cúspides, fraturas coronárias e canalículos dentinários levemente mais delgados e dispersos. Com dose de 1 Gy, foram observadas alterações nos molares irradiados no estágio de sino.

Em 2006, Lopes *et al.* avaliaram a prevalência de alterações dentárias em crianças portadoras de câncer por meio de radiografias panorâmicas. A amostra foi constituída por pacientes tratadas por quimioterapia ou quimioterapia associada a radioterapia na região de cabeça e pescoço e com média de idade de cinco anos. As crianças que receberam quimioterapia associada à radioterapia apresentaram maior incidência de alterações (47%) do que aqueles que receberam apenas a quimioterapia (33%). As alterações mais comumente observadas foram a microdontia, macrodontia, anodontia, taurodontia, além das alterações radiculares.

Boraks *et al.* (2008) avaliaram alterações ultra-estruturais de glândulas parótidas de ratos que receberam uma dose fracionada (1500 cGy) de radiação. Lesões das organelas citoplasmáticas, como dilatação do retículo endoplasmático, destruição das mitocôndrias e formação das vacuolizações citoplasmáticas, além de lesão da membrana celular das células acinares foram observadas através de microscopia eletrônica de transmissão. Portanto, a radiação ionizante promove alterações no parênquima glandular, o que está diretamente relacionado com a dose de radiação absorvida. Determinados

fenômenos que surgem no citoplasma e material nuclear são indicadores de que a radiação ionizante levou a célula acinar à morte programada (apoptose).

Niehoff *et al.*, em 2008, estudaram a ação da dose única de 20 Gy de radiação X nos ossos e dentes da mandíbula do lado direito de ratos. Os animais foram sacrificados 100 dias após a radioterapia. Foram identificadas perda de pelos e redução no crescimento do incisivo inferior direitos. As diferenças na estrutura óssea entre os lados foram visíveis, mas não significativas, não sendo encontradas diferenças nos valores de densidade óssea. A espessura do côndilo mandibular direito estava reduzida em comparação ao esquerdo. Os animais do grupo irradiado apresentaram menor aposição óssea do lado direito quando comparado com o lado esquerdo.

Kaste *et al.* (2009) tiveram como objetivo descrever as frequências e fatores de risco para a saúde bucal alterada e odontogênese em sobreviventes de câncer infantil. Observaram o desenvolvimento de microdontia, hipodontia, esmalte anormal, maior perda de dentes, gengivite severa e xerostomia. A quimioterapia, fatores socioeconômicos, exposição à radiação maior ou igual a 20 Gy foram significativamente associadas com um risco aumentado de apresentarem anomalia dentária. Concluíram que a radioterapia e a quimioterapia são fatores de risco para sequelas bucais/dentais nos sobreviventes de câncer infantil.

No mesmo ano, Vasconcelos *et al.* avaliaram o desenvolvimento dentária em crianças e adolescentes que sofriam de leucemia infantil e foram submetidos à quimioterapia isolada ou associada à radioterapia, comparando a idade dentária com um grupo controle. O desenvolvimento dentário foi analisado por meio de radiografias panorâmicas de 92 crianças divididas em dois grupos: crianças entre 5 e 12 anos com leucemia, e grupo controle. A idade dentária dos indivíduos foi estimada de acordo com Demirjian *et al.* e uma diferença significativa foi encontrada entre a idade cronológica e dentária de pacientes submetidos à terapia anti-neoplásica, quando comparados ao grupo controle, mas não houve diferenças significativas entre os pacientes tratados com diferentes protocolos anti-neoplásicos. Concluiu-se que a terapia anti-neoplásica pode interferir na maturidade dentária de crianças tratadas de câncer, interferindo na formação e desenvolvimento radicular.

Araujo (2010) avaliou a ação da radiação na região odontogênica do incisivo inferior de rato com doses de 5 e 15 Gy, por intermédio da análise histológica e medida da taxa de erupção. Utilizou 30 ratos divididos nos grupos controle, radioterapia 5 Gy e radioterapia 15 Gy. A mensuração da taxa de erupção dentária foi realizada a cada dois dias, perfazendo o tempo total de 16 dias. Os animais do grupo 5 Gy apresentaram valores da taxa de erupção dentária semelhantes ao controle, os animais do grupo 15 Gy apresentaram redução na taxa de erupção dentária a partir do sexto dia do experimento. No início da região odontogênica do grupo 15 Gy, ocorreram irregularidades na organização dos odontoblastos e ameloblastos, alteração na formação da alça epitelial, além da presença de hemorragia. Na região odontogênica correspondente a face distal do terceiro molar, foi possível constatar leves alterações nos odontoblastos na região distal do dente do grupo 5 Gy, quando se compara com o grupo controle. O grupo 15 Gy apresentou destruição com visível redução no tamanho do dente e desorganização nos odontoblastos e ameloblastos; cortes dessa região apresentaram alterações mais severas que no início da região odontogênica. Concluiu-se que a dose de 5 Gy causou leves e pequenas alterações morfológicas e não interferiu na taxa de erupção dentária e que a dose de 15 Gy provocou intensas alterações histológicas e estruturais na região odontogênica do incisivo de rato, e que, a partir do quarto dia após a radioterapia a taxa de erupção diminuiu.

2.2 Modelo de formação dentária de ratos

Segundo Shour & Massler (1971), o dente é mais que um órgão mastigatório. Suas propriedades peculiares são um valioso indicador biológico que reflete e registra, durante o seu desenvolvimento, as condições metabólicas do animal. Estes registros, diferentes daqueles em ossos, não são transitórios, mas são permanentemente gravados no esmalte e dentina, nos quais não ocorre reabsorção.

Nos ratos o incisivo está localizado anteriormente aos molares, estendendo-se na mandíbula, abaixo e além dos molares. O crescimento, calcificação e erupção ocorrem continuamente ao longo da vida, mostrando em um único dente todos os estágios de

formação dentária, desde a inicial até a maturação; portanto, alterações dentais durante sua formação podem ser observadas (Schour & Massler, 1971; Ohshima *et al.*, 2005).

O incisivo do rato consiste de uma coroa que pode ser dividida em duas partes: uma anterior ou convexa, chamada labial que é revestida por esmalte, e um remanescente posterior ou côncavo, na lingual e porções laterais, recobertas por cemento. Os tecidos periodontais dos incisivos são formados por um ligamento periodontal na superfície do dente onde a dentina é coberta por cemento (mesial, lingual e parte da distal), enquanto na labial e parte da distal, o esmalte é coberto pelo órgão dentária e por um tecido conjuntivo muito vascularizado, chamado periodonto relacionado ao esmalte, que é similar aos tecidos que revestem a coroa de dentes de crescimento limitado quando esta está completa e a erupção intraóssea inicia, tais como os molares de roedores (Marks & Schroeder, 1996).

Esses dentes são também continuamente desgastados na borda incisal pelo atrito a que são submetidos. Ohshima *et al.* (2005) descreveram a morfologia do compartimento epitelial apical (região odontogênica), em cortes seriados transversais do incisivo inferior de roedores, mostrando características morfológicas equivalentes aos estágios de botão, capuz e campânula no germe dentário de um molar. Essa região é responsável pela formação contínua da estrutura dentária, através da proliferação celular que ocorre no epitélio da alça cervical e, conseqüentemente, da migração e diferenciação das células ameloblásticas e odontoblásticas em direção incisal.

2.3 Propriedades e mecanismo de ação da vitamina E

O termo vitamina E é usado para descrever a família de oito compostos estruturalmente relacionados consistindo do alfa, beta, gama e delta tocoferol e seus respectivos tocotrienol (Shen *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2007; Takada & Suzuki, 2010). Evidências segurem que tanto o alfa quanto o gama tocoferol apresentam importante atividade anti-inflamatória e anti-oxidante e podem desempenhar um papel preventivo em estados de doença crônica associada com aumento da inflamação e estresse oxidativo (Birringer, 2010; Himmelfarb *et al.*, 2003).

Alfa-tocoferol tem sido o foco da investigação, porque é a forma mais comum e biologicamente ativa (Engin, 2009; Singh *et al.*, 2006). Shen *et al.* (2006) relataram que a abundância de α -tocoferol no corpo humano e sua eficiência, comparável com as moléculas de vitamina E, leva-a a ser estudada como principal tema para pesquisas básica e clínica. Sua principal ação é a anti-oxidante, lipossolúvel, seu mecanismo de ação é proteger as membranas fosfolipídicas, inibindo a peroxidação lipídica, auxiliando na regeneração tecidual e no combate aos radicais livres (Wu & Corft, 2007).

O tocoferol administrado por via oral é absorvido pelo trato intestinal por um mecanismo semelhante ao das outras vitaminas lipossolúveis aproximadamente em 2/3 do valor ingerido sendo solubilizado pelos ácidos biliares. A porção não absorvida é eliminada pelas fezes (Lemaire-Ewing *et al.*, 2010). É transportado no plasma como tocoferol livre, sendo rapidamente distribuído nos tecidos. Armazena-se no tecido adiposo, é lentamente excretado pela bile e o restante é eliminado pela urina (Brigelius-Flohé & Traber, 1999). Em contraste com outras vitaminas lipídicas nenhum efeito tóxico ocorre mesmo quando altas doses suplementares são ingeridas (Lemaire-Ewing *et al.*, 2010).

Quando ocorre uma inflamação, reporta-se que a vitamina E exerce efeitos pro ou anti-inflamatórios dependendo do tipo celular e do modelo experimental. O mecanismo envolvido no aumento induzido da ativação na fosforilação de células T pela vitamina E é relatado pela redistribuição de proteínas sinalizadoras associadas a jangadas lipídicas. O tocoferol media a inibição do transporte de proteínas o que irá resultar na atenuação da liberação de citocinas inflamatórias (Lemaire-Ewing *et al.*, 2010).

Lindshield *et al.* (2010) ressaltando que o licopeno, selênio e vitamina E são micronutrientes comumente consumidos por homens diagnosticados com câncer de próstata, avaliaram os efeitos de licopeno (250 mg/kg), selênio (methylselenocysteine, 1 mg/kg) e vitamina E (γ -tocoferol, 200 mg/kg) isoladamente e em combinação sobre o crescimento de adenocarcinomas na próstata de ratos. Dietas contendo estes micronutrientes foram administradas durante 4 a 6 semanas antes da implantação do tumor por injeção subcutânea. Nos vários grupos de dieta, o selênio promoveu diminuição da área final, do peso do tumor e do peso do tumor versus peso corporal, o licopeno e o γ -tocoferol não alteraram qualquer uma dessas medidas. Não houve interações significativas

entre as combinações de nutrientes sobre o crescimento do tumor. Concluíram que apenas o consumo de selênio reduziu o crescimento do tumor de próstata.

Para determinar o efeito da vitamina E sobre a expressão da adiponectina e leptina em ratos obesos, Shen *et al.*, em 2010, utilizaram trinta machos que foram divididos em três grupos: (1) grupo de controle, alimentados com ração normal, (2) grupo obesidade induzida por dieta, alimentados com uma dieta rica em gordura e (3) grupo intervenção, alimentado com um alto teor de gordura e dieta suplementada com vitamina E (350 mg/kg). Após 10 semanas alimentados, os ratos foram pesados e sacrificados. Sangue e tecidos adiposo foram recolhidos e níveis de mRNA, proteína de leptina e adiponectina foram medidos. Os níveis de adiponectina e leptina foram mais baixos no grupo 2 do que no grupo de controle e a intervenção de vitamina E aumentou a expressão de leptina e adiponectina. A análise mostrou que os níveis de leptina se correlacionaram positivamente com a massa de gordura corporal. Logo, concluíram que a administração de vitamina E diminui expressão de leptina e adiponectina em ratos obesos e que os antioxidantes podem desempenhar um papel importante no tratamento de doenças relacionadas com a obesidade.

Pedrelli *et al.*, em 2011, avaliaram a eficácia profilática de um agente tópico, contendo 10% de tocoferóis e tocotrienóis 0,3%, em 30 pacientes com fotossensibilidade em comparação com o retinol, um veículo simples e áreas não tratadas (controle). Após a determinação da dose mínima de eritema com UVB, duas áreas de 2 x 2 cm foram seleccionados sobre as nádegas de cada paciente, uma das quais foi tratado com a formulação antioxidante enquanto que o outro campo não foi submetido a qualquer tratamento. Avaliação de reações foi realizada atribuindo escores indicativos de sua intensidade. Todas as reações da irradiação foram significativamente mais baixas nas áreas tratadas com a formulação tópica de vitamina E em comparação com os tratados com o veículo simples ou retinol. Concluíram que a utilização da formulação tópica que contém concentrações significativas de tocotrienóis e tocoferóis representa uma estratégia promissora para reduzir os danos da pele foto-induzida.

2.4 Estudo do efeito radioprotetor da vitamina E

Entre os análogos selecionados e os ésteres de α -tocoferol testados para radioproteção, éster α -hemissuccinato (α -tocoferol succinato) e uma analógica insaturados (γ -tocotrienol) quando administrado subcutaneamente em ratos 24 horas antes da irradiação, protegem contra irradiação gama (Singh *et al.*, 2006). Para Prasad *et al.* (2002) a eficácia radioprotetora do α -tocoferol e abordagens nutricionais de radioproteção, indicaram que α -tocoferol é eficaz quando administrado 24 horas antes da irradiação na dose de 400 mg/kg de peso corporal.

Em suas revisões de literatura, Prasad *et al.* (2002) enfatizaram a importância de se estabelecer uma dosagem para os antioxidantes e recomendaram a administração diária dos mesmos em menos de 48 horas antes da irradiação. Como resultado, essa dosagem pré-determinada pode dar início a danos em células tumorais, mas não em células em condições normais antes da radioterapia. A permanência de antioxidantes pós-irradiação é importante a fim de reduzir a taxa de reparo de células tumorais que sofreram danos pela radiação, mas não de células normais.

A ação radioprotetora da vitamina E é estudada há muito tempo. Trabalhos como o de Rostock *et al.* (1980), que estudaram altas doses de vitamina E como agente radioprotetor com 60 ratos machos divididos em controle, 15 e 20 Gy e receberam uma dieta de 2,5% de vitamina E por duas semanas antes da radioterapia e 4 horas antes da radiação uma injeção intraperitoneal solúvel e água (150 mg). Comparando 180 dias de sobrevivência e histologia dos pulmões e coração dos animais constatou-se que não houve diferença estatística entre os grupos e que a vitamina E não foi um eficaz agente radioprotetor.

Felemovicius *et al.* (1995) testaram a vitamina E como um radioprotetor para o intestino do rato. Foram realizadas aplicações tópicas 30 minutos antes da radioterapia por meio cirúrgico nos animais em quatro grupos: (1) solução salina; (2) veículo óleo de soja; (3) α -tocoferol com solução salina; (4) α -tocoferol com óleo de soja. Outra etapa da pesquisa realizou ingestão suplementar na dieta de 250 UI de alfa-tocoferol 10 dias antes da radioterapia (1100 cGy). Os animais foram sacrificados 5 dias após a radioterapia. O

número de células do intestino delgado, cripta, altura da mucosa e número de células caliciformes foram significativamente protegidos dos efeitos da radiação nos animais que receberam a vitamina E. Constataram que a vitamina E pode servir como um protetor de irradiação parcial contra a enterite aguda, se administrada como pré-tratamento oral ou como uma aplicação tópica breve.

Manzi *et al.* (2003) avaliaram a ação radioprotetora da vitamina E no processo de reparo tecidual em ratos após procedimento cirúrgico. Os animais foram divididos em grupo controle, vitamina E, vitamina E irradiado e óleo de oliva irradiado. Os animais dos grupos submetidos à radioterapia foram expostos 03 (três) dias após a cirurgia e os que receberam a vitamina E foi injetado uma dose de 90 UI de pré-tratamento. A ação foi avaliada em lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina e análise morfológica aos 4, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. Constatou-se que a vitamina E apresentou ação radioprotetora eficaz na dose de 6 Gy.

A preparação de monoglicosídeo alfa-tocoferol (TMG) administrado intraperitoneal na dose de 600 mg/kg imediatamente após a irradiação gama foi examinado por Cherdyntseva *et al.* (2005) para verificar a eficácia como radioprotetor da medula óssea e no sangue periférico de células nucleadas. Quando os ratos receberam uma dose de 5,6 Gy, uma diminuição marcada de células nucleadas na medula óssea e uma redução de leucócitos periféricos dentro do período pós-irradiados foram observadas. No entanto, essas alterações foram atenuadas nos ratos tratados com TMG. O retorno ao valor normal da contagem de leucócitos reduzido no sangue a partir do dia 8 foi mais rápido nos ratos tratados com TMG do que em ratos irradiados não tratados. Esses resultados indicam que o efeito radioprotetor do TMG é, aparentemente, realizado através de sua influência sobre o sistema hematopoiético.

Koizumi *et al.* (2005) avaliaram o ácido ascórbico glucosídeo (AsAG) e o monoglicosídeo de α -tocoferol (TMG), como inibidores de efeitos colaterais de radioterapia e quimioterapia. A radioterapia foi aplicada nos pacientes com metástase cerebral ou em coluna vertebral, os quais receberam 30 Gy / 10 fr / 2 W. Os pacientes com câncer de mama ou câncer colo uterino receberam quimioterapia com protocolos individuais. Foi administrado via oral de 1 mg/kg de TMG logo após a quimioterapia ou

200 mg/kg de AsAG duas a três horas antes de cada quimioterapia. A administração oral de 200 mg/kg de AsAG antecipadamente ou 1 mg/kg TMG imediatamente após a radioterapia ou quimioterapia impediu efeitos secundários, tais como náusea severa ou diarreia freqüente. Concluíram que essas vitaminas inibiram efetivamente o efeito adverso de radioterapia ou quimioterapia.

Ramos *et al.* (2006) avaliaram o efeito radioprotetor da vitamina E na função da glândula salivar, bem como analisaram a concentração de proteína total. Foram utilizados ratos machos e divididos em cinco grupos: controle, óleo de oliva irradiado, irradiado, vitamina E e vitamina E irradiado. A dose aplicada na radioterapia foi única de 15 Gy. Os animais foram sacrificados 4, 8 horas e 30 dias após a irradiação. Não foram observadas diferenças no volume salivar entre os grupos de 4 e 8 h. Em 30 dias, o volume salivar dos animais do grupo óleo de oliva irradiado foi significativamente reduzido em relação ao grupo controle. O grupo irradiado apresentou volume salivar significativamente diminuído. Na composição salivar, não foram observadas diferenças significativas no teor de proteína total entre os grupos estudados. Concluiu-se que a radiação não teve efeito sobre o teor de proteína total e que a vitamina E com uma dose de 360 mg/kg protegeu a função salivar 30 dias após a irradiação.

Singh *et al.* (2006) avaliaram o efeito radioprotetor da vitamina E em ratos e seus ésteres avaliando as citocinas hematopoiéticas. Foram utilizados α -tocoferol, δ -tocoferol, γ -tocoferol e tocotrienol, α -tocoferol succinato e acetato de tocoferol em ratos, sendo aplicado 400 mg/kg com um veículo (polietileno glicol) 24 horas antes da radiação gama de dose total que variou de 3 e 7 Gy. Foram realizadas coletas de sangue 24 horas e 4 dias após a administração do medicamento e avaliado pelo teste Elisa sanduíche para detectar citocinas e pelo Luminex multiplex para confirmar os achados. Os resultados indicaram que a eficácia superior do radioprotetor α -tocoferol succinato pode ser devido à indução relativamente maior de G-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos) e interleucina 6.

Chitra & Shiamala Devi (2008) objetivaram avaliar os efeitos da radiação e do α -tocoferol no fluxo salivar e em parâmetros salivares selecionados de pacientes com câncer de boca. Os pacientes foram divididos em quatro grupos. Um grupo tratado com

radioterapia durante três semanas, o segundo tratado com radioterapia durante seis semanas, o terceiro tratado com radioterapia durante três semanas suplementado com α -tocoferol e o último tratado com radioterapia durante seis semanas suplementado com α -tocoferol. Toda a saliva foi coletada antes, durante e ao final da radioterapia e simultaneamente foi realizada a suplementação com α -tocoferol nesses pacientes que pertenciam aos grupos suplementados. A redução do fluxo salivar, da atividade da amilase, de proteína total e sódio, e o aumento do pH e potássio ocorreu no grupo tratado por radioterapia durante seis semanas sem suplementação. Quando o α -tocoferol foi administrado, uma melhora significativa nesses níveis pôde ser observada. A redução no fluxo salivar promoveu crescimento da microflora bacteriana e causou dificuldade na fala e deglutição, afetando a qualidade de vida dos pacientes, sendo que o α -tocoferol aumentou o fluxo salivar e manteve o meio bucal adequado nos pacientes.

No mesmo ano, Sezen *et al.* utilizaram ratos para determinar os efeitos da vitamina E e da L-carnitina, individualmente ou combinadas, nos danos radioinduzidos no cérebro e retina. Foram aplicados 40 mg/kg ao dia de vitamina E intramuscular e/ou 200 mg/kg ao dia de L-carnitina intraperitoneal, iniciando 04 horas antes da radioterapia de 15 Gy até 10 dias após a mesma. Através dos dados obtidos, concordaram com os demais estudos em relação ao papel radioprotetor e antioxidante da vitamina E e da L-carnitina. No entanto, o uso combinado dessas substâncias não apresentou um aumento no efeito radioprotetor das mesmas.

Wambi *et al.* (2008) avaliaram uma dieta usando suplemento composto por L-selenometionina, vitamina C, succinato de vitamina E, ácido e lipóico-N-acetil cisteína na sobrevida de ratos após irradiação. O pré-tratamento de animais com doses de antioxidantes significativamente mais elevadas resultaram em um aumento de células brancas do sangue e neutrófilos em sangue periférico 4 e 24 horas após a radiação de 1 Gy e 8 Gy. Os antioxidantes são eficazes na prevenção de linfopenia periférica somente após baixa dose de radiação. Verificaram que o uso de antioxidantes aumentou significativamente a sobrevida dos ratos após exposição a uma dose potencialmente letal de raios X, quando administrado antes ou após a irradiação. A suplementação com antioxidantes foi também associada com o aumento de células da medula óssea após irradiação. Concluíram que

suplementação oral com antioxidantes parece ser eficaz para radioproteção de células hematopoiéticas e melhora da sobrevivência, e a modulação da apoptose é uma consequência do mecanismo de radioproteção do sistema hematopoiético pelos antioxidantes.

Singh *et al.* (2009) avaliaram o efeito radioprotetor do succinato de α -tocoferol (TS) em ratos. Foram injetados 400 mg/kg nos animais e irradiados com diferentes doses de radiação γ (3 e 7 Gy). Células de sangue periférico foram coletadas. TS protegeu significativamente os ratos contra doses letais de radiação, reduziu significativamente trombocitopenia, neutropenia e monocitopenia, não teve efeito significativo sobre os linfócitos, indicando que pode ser útil apenas para os compartimentos de células mielóides. Concluíram que o TS pode ser desenvolvido como um radioprotetor para os seres humanos contra os efeitos potencialmente letais de exposição à radiação.

Estes mesmos autores em 2010, realizaram uma pesquisa com finalidade de elucidar o papel do G-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos) induzido, em resposta a administração de α -tocoferol succinato na proteção de camundongos irradiados no corpo todo. O papel de G-CSF na sobrevivência após a irradiação foi determinada por ratos no tratamento da doença com uma dose de proteção de TS (400 mg/kg), 24 horas antes da exposição a uma dose letal (9,2 Gy; 0,6 Gy/min) de irradiação γ cobalto 60. Os camundongos tratados receberam anticorpos neutralizantes para G-CSF 16 horas antes da irradiação, para verificar a eficácia radioprotetora do TS. Os níveis máximos de G-CSF foram observados em sangue periférico 24 h após administração de TS. Quando os animais receberam o anticorpo neutralizante para o G-CSF, o TS não protegeu contra a radiação. Depois de serem desafiados com um LD90/30 (dose letal causando mortalidade de 90% ao longo de 30 dias), os animais tratados exibiram sobrevivência significativamente maior. Os resultados indicaram que o G-CSF pela administração de TS mobilizou as células hematopoiéticas e foi responsável pela proteção contra a radiação ionizante.

Kulkarni *et al.* (2010) estudaram o efeito radioprotetor do gama tocotrienol sobre células-tronco hematopoéticas (HSCs) e células progenitoras (HPCs) em camundongos subletalmente irradiados. A análise de citometria de fluxo indicou que a radiação reduziu as HPCs para 40% no dia 2 e 4 após a irradiação total do corpo em todos os grupos de tratamento. Os números de HPC em ratos tratados com gama tocotrienol

gerou uma recuperação quase completa (90%) no dia 7 do experimento, mas manteve-se empobrecida em ratos tratados com o veículo (30%), mesmo no dia 13 após a radiação. Animais irradiados que foram tratados com gama tocotrienol mantiveram um maior número de colônias, preservando assim a capacidade auto-renovável de HSCs. O tratamento com gama tocotrienol também reduziu a frequência de eritrócitos micronucleados significativamente. Concluíram que o gama tocotrienol protegeu o tecido hematopoiético, preservando os HSCs e HPCS e prevenindo danos ao DNA persistente.

Singh *et al.* (2012) estudaram o papel α -tocoferol succinato na proteção de camundongos com síndrome gastrointestinal induzida por irradiação no corpo todo. Foram injetados subcutaneamente 400 mg/kg de α -tocoferol succinato e expostos a diferentes doses de radiação, sendo monitorados durante 30 dias. Os resultados demonstram sobrevivência de um significativo número de ratos irradiados com 9,5; 10; 11 e 11,5 Gy, quando a administração da solução ocorreu 24 horas antes. O α -tocoferol succinato também protegeu o tecido intestinal de ratos irradiados em termos de cripta e número de vilosidades. Concluíram que o α -tocoferol succinato protegeu os ratos do dano gastrointestinal por radiação induzida.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo neste trabalho foi avaliar, por meio de análise histológica e taxa de erupção dentária, o efeito da vitamina E na região odontogênica de incisivos de ratos como radioprotetor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, sob protocolo número 1843-1 (Anexo 1). Foram utilizados, no total, 40 ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus Wistar*), machos, com idade entre oito e dez semanas e peso médio de 220 gramas, procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Durante a realização do estudo, os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, as quais permaneceram em ambiente com temperatura e umidade controladas e um ciclo alternado de 12 horas claro-escuro. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum*, diariamente.

4.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, sendo três grupos experimentais, contendo inicialmente dez animais cada, conforme descrito abaixo e, sucintamente, apresentado na Tabela 1.

- Grupo Controle (C): os animais foram submetidos à gavagem *sham* e radioterapia *sham*;
- Grupo Radioterapia 15 Gy (R): os animais foram submetidos a dose única de radioterapia de 15 Gy na região de cabeça e pescoço e realizada gavagem *sham*;
- Grupo óleo de oliva + Radioterapia 15 Gy (RO): os animais receberam dose única de 15 Gy de radioterapia na região de cabeça e pescoço. Durante três dias antes e três dias após, foi administrado óleo de oliva (4 ml/kg) via oral através da gavagem;
- Grupo vitamina E + Óleo de oliva + Radioterapia 15 Gy (ROV): os animais receberam dose única de 15 Gy de radioterapia na região de cabeça e pescoço. Durante três dias antes e três dias após, foi administrado óleo de oliva (4 ml/kg) com alfa-tocoferol (360 mg/kg) via oral através da gavagem.

Tabela 1 - Diferentes grupos experimentais utilizados neste estudo.

<i>Grupos</i>	<i>Número de ratos</i>	<i>Dose de radiação</i>	<i>Tratamento</i>
C	10	Não	Não
R	10	15 Gy	Não
RO	10	15 Gy	4 ml/kg corpóreo de óleo de oliva
ROV	10	15 Gy	360 mg/kg corpóreo de α -tocoferol diluído em 4 ml/kg de óleo de oliva

4.2 Tratamento

Aos animais pertencentes aos grupos que receberam óleo de oliva foram administrados 4 ml/Kg (peso corpóreo) de óleo de oliva. O grupo tratado com Vitamina E, foram administrados 360 mg/Kg (peso corpóreo) de vitamina E (alfa-tocoferol) diluídos em 4 ml/Kg de óleo de oliva. A administração foi realizada via oral, utilizando uma agulha para gavagem conectada a uma seringa de 3 ml, permitindo que as soluções fossem depositadas diretamente no estômago dos animais (Figura 1). A aplicação da vitamina E foi realizada diariamente 60, 36 e 12 horas antes e após da radioterapia.



Figura 1 - Animal submetido à gavagem com a deposição das substâncias diretamente no estômago.

4.3 Processo de radioterapia

Previamente ao procedimento de irradiação, todos os animais dos grupos experimentais foram anestesiados, via intramuscular, com 80 mg/kg de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® Agribrands do Brasil Ltda.; Paulínia, São Paulo, Brasil) e 8 mg/kg de Cloridrato de Xylasina (Rompum®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Os animais experimentais receberam dose única de 15 Gy de radiação, a partir de um acelerador linear, da marca Varian, modelo Clinic 6/100 com distância focal de 100 cm. O campo de

colimação foi de 15 x 30 cm, de modo que apenas a região de cabeça e pescoço fosse irradiada (Figura 2).



Figura 2 – Visão detalhada dos ratos posicionados para o procedimento de irradiação da região de cabeça e pescoço.

4.4 Avaliação da taxa de erupção dentária

A taxa de erupção dentária foi medida em todos os animais. Para tal, foi realizada uma marca linear na face vestibular dos incisivos inferiores com uma broca cilíndrica diamantada adaptada a uma caneta de alta rotação sob refrigeração. Com o auxílio de uma ocular milimetrada (Ernest Leitz Wetzlar Germany 12,5x) adaptada à lupa

estereoscópica, e, utilizando-se para calibração uma régua milimetrada (Carl Zeiss 5+ 100/100 mm), foi medida a distância da margem gengival até a marca confeccionada com a broca diamantada (Figura 3), sendo este procedimento repetido três vezes para confirmação dos valores. Para a obtenção das medidas, os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália, Brasil). Os valores da marcação realizada no dente até a margem gengival foram anotados iniciando-se no dia da radioterapia a cada dois dias até o do sacrifício (14 dias após a radioterapia) totalizando sete medidas, portanto a primeira medida da taxa de erupção dentária foi constatada dois dias após a radioterapia. Quando a marca se aproximava da borda incisal do dente que estava sendo desgastada pelo atrito, uma nova marca era realizada. Para uma melhor confirmação dos dados, foi realizada a verificação da taxa de erupção tanto no incisivo inferior direito quanto no esquerdo e o valor final da erupção diária foi dado pela média destes valores. Os valores foram transformados em milímetros e analisados estatisticamente.

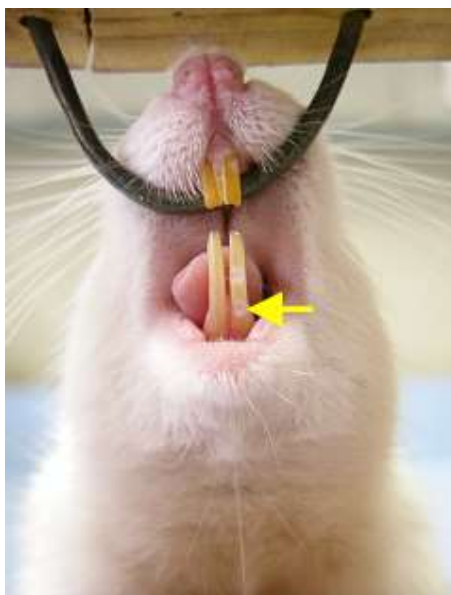


Figura 3 - Marcação no dente incisivo inferior do rato para medição da taxa de erupção dentária ao longo dos dias.

4.5 Obtenção e Preparo das peças

Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 14 dias após a radioterapia. As hemimandíbulas dos ratos foram removidas e fixadas por imersão em formol 10% tamponado. Após a coleta, cada hemimandíbula com disco de corte diamantado, alta concentração, dupla face, dimensões de 4" X 0,12" X 1/2 (102 mm X 0,3 mm X 12,7 mm) (EXTEC corp., Diamond Wafering Blade) foi cortada ao meio (Figura 4) e mantidas em formol 10% tamponado por 24 horas sob agitação para promover uma melhor fixação.

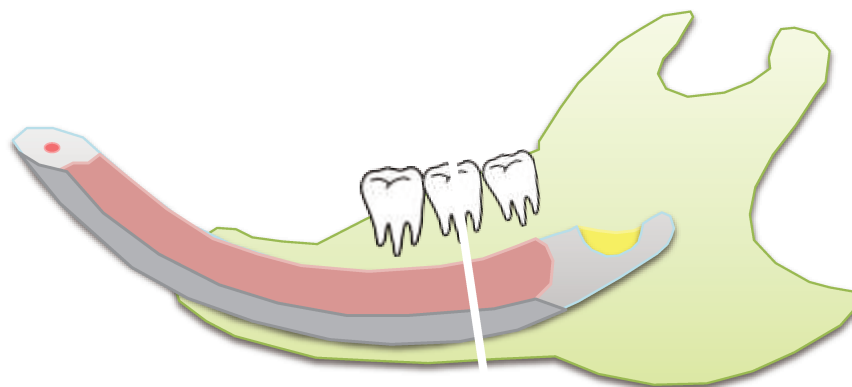


Figura 4 – Esquema representando a secção da hemimandíbula em duas partes para promover uma melhor fixação.

4.6 Procedimento Histológico

Após a fixação, as hemimandíbulas foram descalcificadas com EDTA 4,13% em tampão fosfato pH 7,4, durante 30 dias com troca da solução diariamente. A região odontogênica foi separada com uma lâmina de barbear a partir da face mesial do terceiro molar, desidratadas em soluções crescentes de etanol, diafanizadas e incluídas em Paraplast Plus ®: Tissue Embedding Medium (McCormickTM Scientific, Leica Biosystems St. Louis LLC, USA). Cortes semi-seriados com 5 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo Leica RM 2155 (Leica - Flüssigkeit, Alemanha), de acordo com o protocolo

estabelecido pela disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Nas hemimandíbulas do lado esquerdo, cortes histológicos longitudinais foram realizados em relação ao longo eixo do incisivo. A partir de cada bloco foram obtidas dez lâminas histológicas, contendo três cortes cada. Esses cortes foram obtidos apenas para determinar a extensão da lesão pela radioterapia, a partir da região odontogênica em direção à incisal. Nas hemimandíbulas do lado direito, os cortes histológicos realizados foram transversais em relação ao longo eixo do incisivo. Os cortes semi-seriados foram realizados a partir do início da região odontogênica em direção à borda incisal do incisivo. Foram analisados cortes do início da região odontogênica e cortes da região odontogênica correspondente a face distal do terceiro molar, como demonstra o esquema da figura 5.

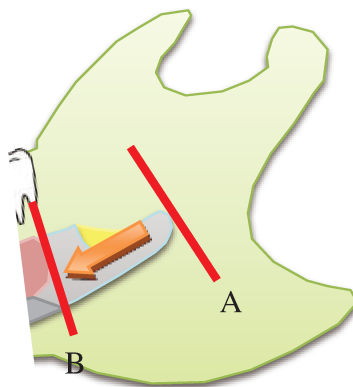


Figura 5 – Esquema representando a disposição dos cortes histológicos transversais nas regiões selecionadas a partir dos cortes longitudinais. *Os cortes semi-seriados foram realizados a partir da região odontogênica em direção à borda incisal do dente incisivo.

A: Início da região odontogênica do incisivo.

B: Região odontogênica do incisivo, correspondente à face distal do terceiro molar.

4.7 Avaliação

Para avaliação morfológica, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, montadas em bálsamo do Canadá e analisadas em microscópio de luz comum.

Para a avaliação da taxa de erupção dentária os dados foram tabulados em milímetros, divididos nos grupos estudados e avaliados estatisticamente. Inicialmente foi realizada análise exploratória e como os dados violavam a suposição de esfericidade pelo teste de Mauchly ($p < 0,0001$) foi necessária a aplicação da metodologia de modelos lineares mistos pelo procedimento PROC MIXED (SAS*). As médias dos tratamentos foram comparadas usando o comando LSmeans e teste de Tukey-Kramer considerando o nível de significância de 5%. *SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, Release 9.1, 2003.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

No dia do sacrifício foi possível observar que os ratos submetidos à radioterapia apresentavam queimaduras, sangramentos e perda de pelos (alopécia) quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 6).



Figura 6 - Aspectos clínicos dos animais dos grupos controle e experimentais na pesquisa, respectivamente.

Inicialmente os grupos eram formados por 10 animais cada, entretanto devido a efeitos da gavagem e radioterapia, alguns animais dos grupos experimentais morreram. Os animais sobreviventes estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição inicial e final dos animais no decorrer da pesquisa.

<i>Grupos</i>	<i>Número inicial de ratos</i>	<i>Número de ratos no dia do sacrifício</i>
C	10	10
R	10	9
RO	10	9
ROV	10	8

Na figura 7 observam-se os valores médios das taxas de peso dos ratos, valor dado em gramas, que demonstra similaridade nos grupos experimentais. Ocorreu perda de peso dos animais experimentais após a radioterapia e a partir do 12º dia do experimento estes animais começaram a ganhar o peso perdido.

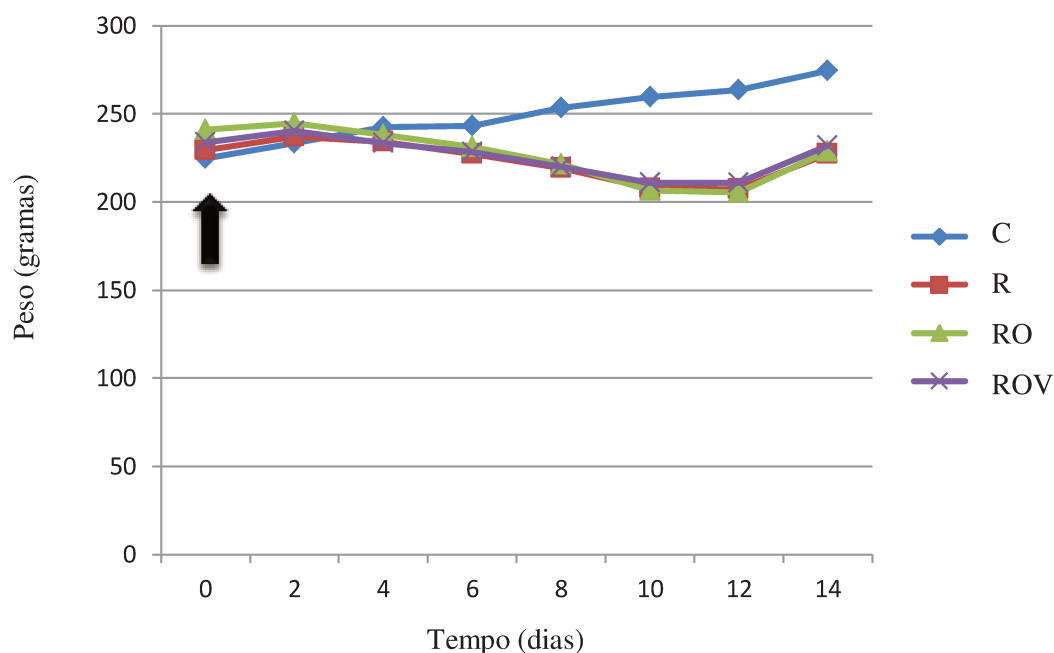


Figura 7 – Valor médio do peso dos ratos (em gramas) durante a pesquisa. A radioterapia foi aplicada no início do experimento (seta).

5.2 Taxa de erupção

Na tabela 3, observam-se os resultados dos valores da média e desvio padrão da taxa de erupção dentária em ratos submetidos à dose de radioterapia de 15 Gy. No segundo e no quarto dia após a radioterapia, a taxa de erupção dentária permaneceu semelhante comparando o grupo controle e experimentais. No sexto dia do experimento, constatou-se redução na taxa de erupção dentária dos grupos experimentais radioterapia e óleo de oliva com o grupo controle. O grupo vitamina E não apresentou diferença estatística até o dia 08 do experimento. A partir do décimo dia após a radioterapia ocorreu diminuição significativa na taxa de erupção dentária de todos os ratos experimentais em relação ao grupo controle.

Tabela 3 - Médias (desvio padrão) dos valores das taxas de erupção dentária dos ratos.

	C	R	RO	ROV
Dia 2	0.54 (0.04) Aa	0.45 (0.04) Aab	0.44 (0.04) Aab	0.46 (0.07) Aabc
Dia 4	0.55 (0.05) Aa	0.51 (0.04) Aa	0.50 (0.05) Aa	0.53 (0.06) Aa
Dia 6	0.54 (0.06) Aa	0.43 (0.05) Bbc	0.44 (0.04) Bab	0.45 (0.05) ABabc
Dia 8	0.55 (0.05) Aa	0.41 (0.04) Bbc	0.44 (0.03) Bab	0.46 (0.05) ABab
Dia 10	0.56 (0.05) Aa	0.40 (0.05) Bbc	0.43 (0.03) Bab	0.43 (0.05) Bbc
Dia 12	0.55 (0.03) Aa	0.37 (0.06) Bbc	0.40 (0.05) Bb	0.39 (0.03) Bcd
Dia 14	0.56 (0.04) Aa	0.36 (0.05) Bb	0.38 (0.06) Bb	0.37 (0.03) Bd

*Letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) indicam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0,05$).

A figura 8 demonstra os resultados das taxas de erupção dentária nos grupos controle e submetidos à radioterapia com dose de 15 Gy com ou sem tratamento.

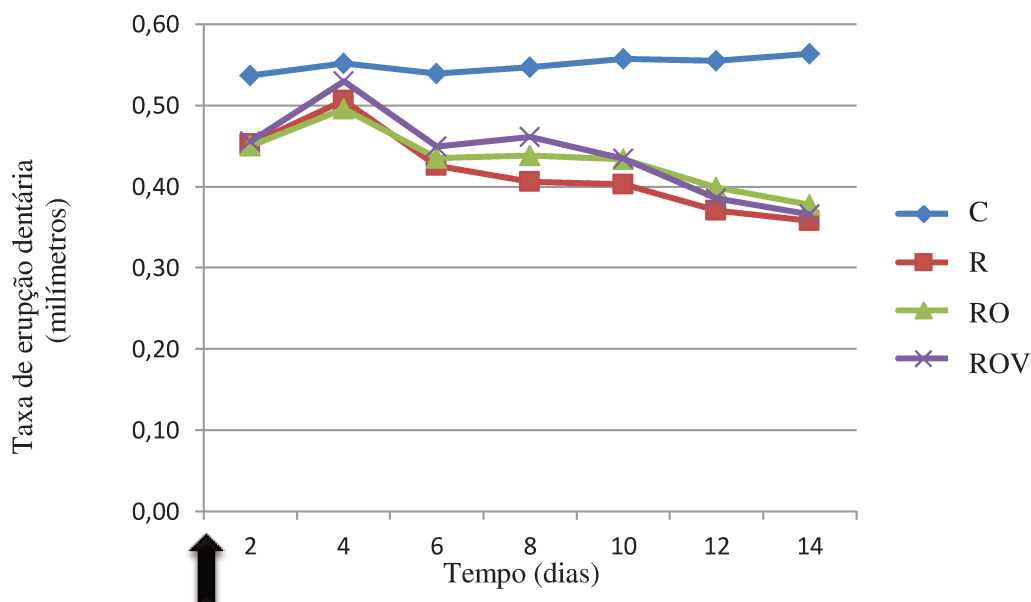


Figura 8 - Valor médio da taxa de erupção dentária (em milímetros) em ratos dos grupos controle e experimentais. A radioterapia foi aplicada no início do experimento (seta).

5.2 Avaliação histológica

5.2.1 Início da região odontogênica

No órgão dentário do grupo controle observou-se um aspecto semelhante a uma ferradura, todo rodeado por um tecido conjuntivo bem vascularizado chamado folículo dentário. Os odontoblastos apresentavam-se bem organizados, polarizados e íntegros, dispostos em paliçada, constituindo uma só camada de células contornando a papila dentária, com aspecto colunar. Os pré-ameloblastos estavam organizados como células cilíndricas altas e polarizados e as células da papila dentária dispostas uniformemente apresentando células indiferenciadas, fusiformes ou estreladas, com numerosos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 9).

Nos grupos que foram submetidos à radiação, observou-se que ocorreu uma aparente redução na população celular na região do folículo adjacente à face lingual do órgão dentário sugerindo uma região mais fibrilar (pobre em células), quando comparado

ao grupo controle. Observou-se ainda alterações na formação da alça epitelial do órgão dentário independente do tratamento aplicado nesses.

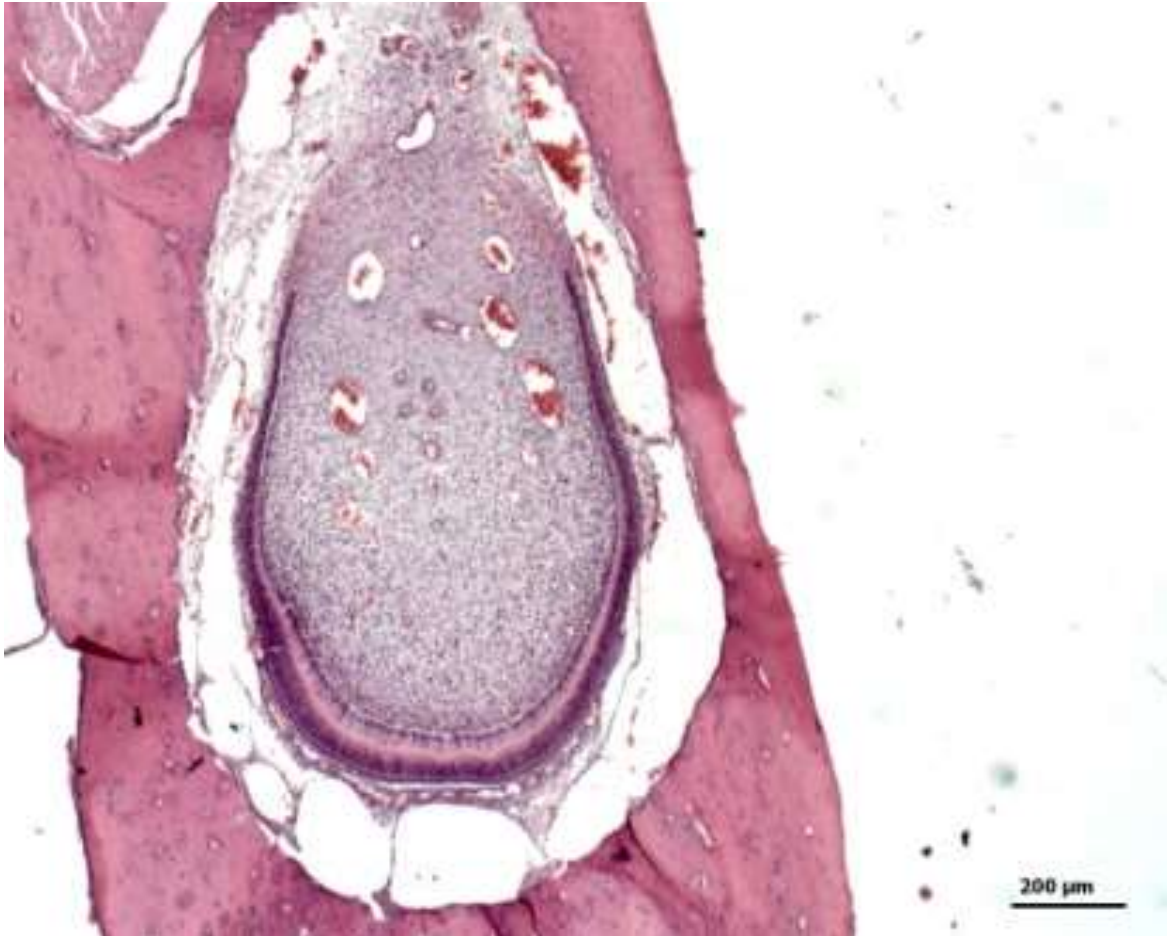


Figura 9 - Lâmina histológica do grupo controle demonstrando o aspecto semelhante à ferradura com odontoblastos e pré-ameloblastos organizados e células da papila dentária dispostas uniformemente.

Na figura 10 é possível comparar os aspectos histológicos entre os grupos estudados. Nos animais experimentais, foi possível observar alterações significativas quando comparados ao grupo controle tais como extravasamento de hemácias dos vasos sanguíneos evidenciando a ocorrência de hemorragia, alteração na formação da alça cervical e aparente redução do número de células na região do folículo adjacente à face lingual do órgão dentário, como demonstrado nas figuras 11 e 12.

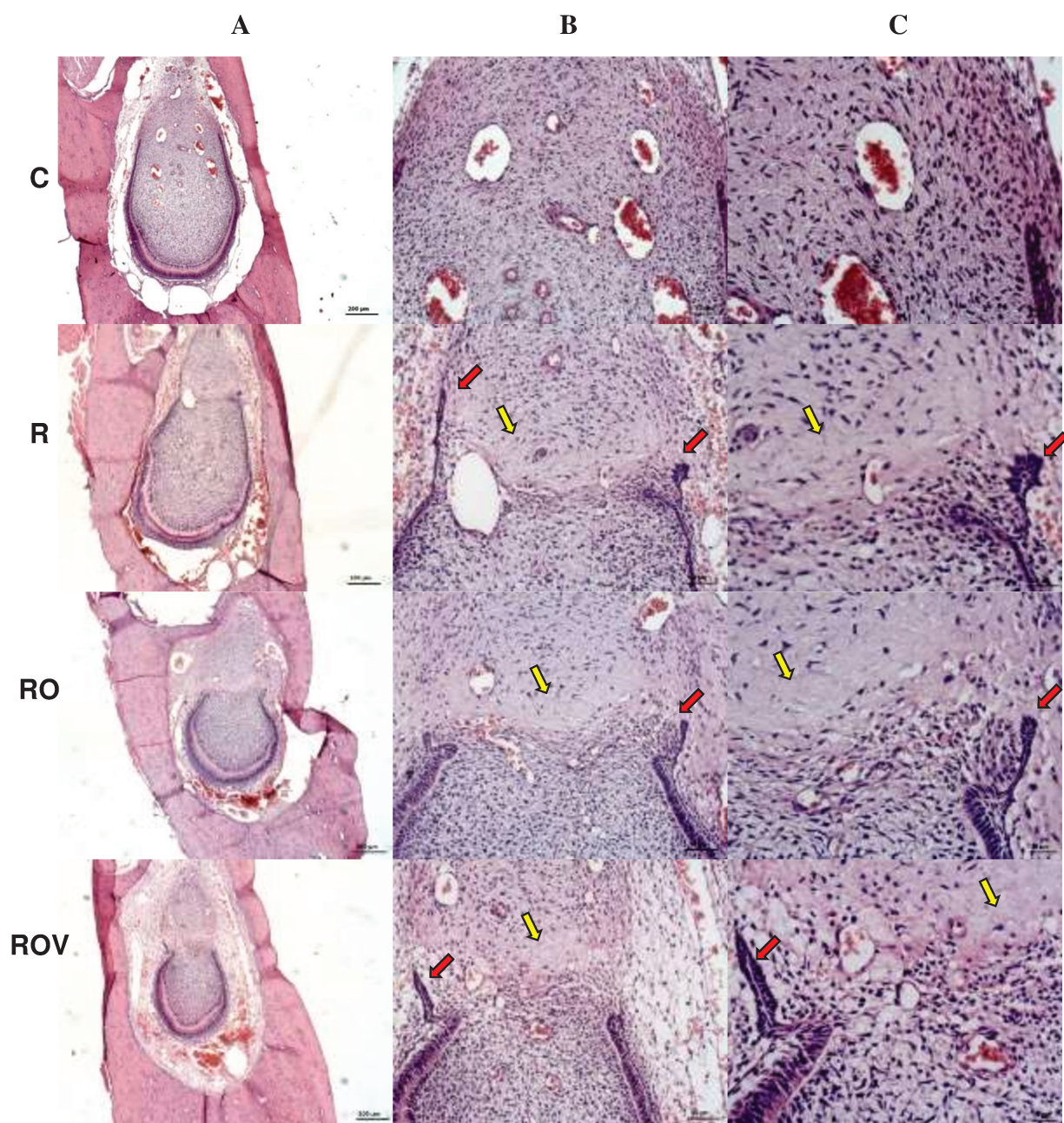


Figura 10 – Cortes histológicos transversais do início da região odontogênica de incisivos de ratos nos grupos controle (C), radioterapia 15 Gy (R), óleo de oliva 15 Gy (RO) e vitamina E 15 Gy (ROV). A seta vermelha marca alteração na formação da alça epitelial e a amarela mostra uma redução no número de células na região do folículo adjacente à face lingual do órgão dentário. Na coluna A o valor da barra corresponde a 200 μm , na B a 50 μm e na C a 20 μm .

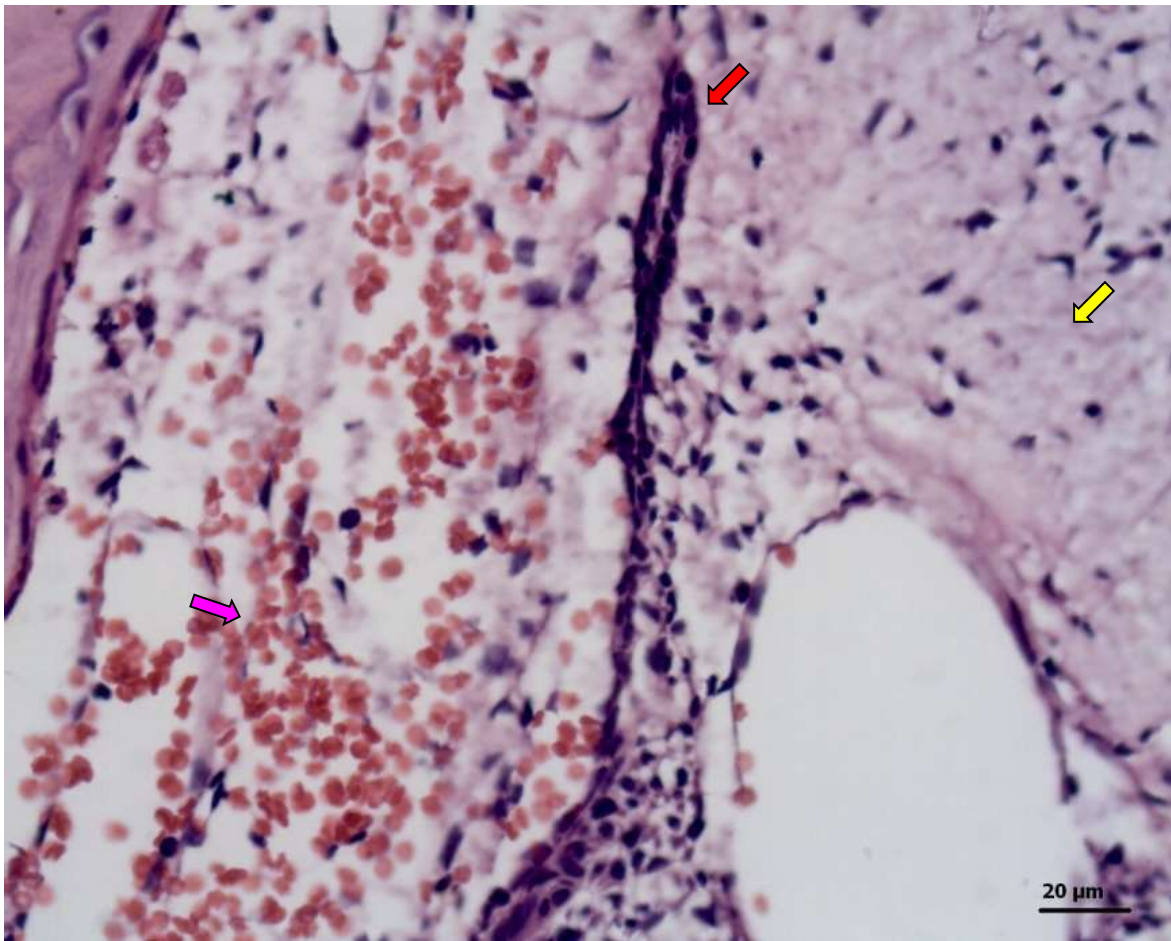


Figura 11 – Nesta lâmina do grupo R é possível observar a presença de hemácias fora dos vasos sanguíneos, caracterizando hemorragia (seta rosa), alteração da alça epitelial (seta vermelha) e aparente redução na população celular (seta amarela).

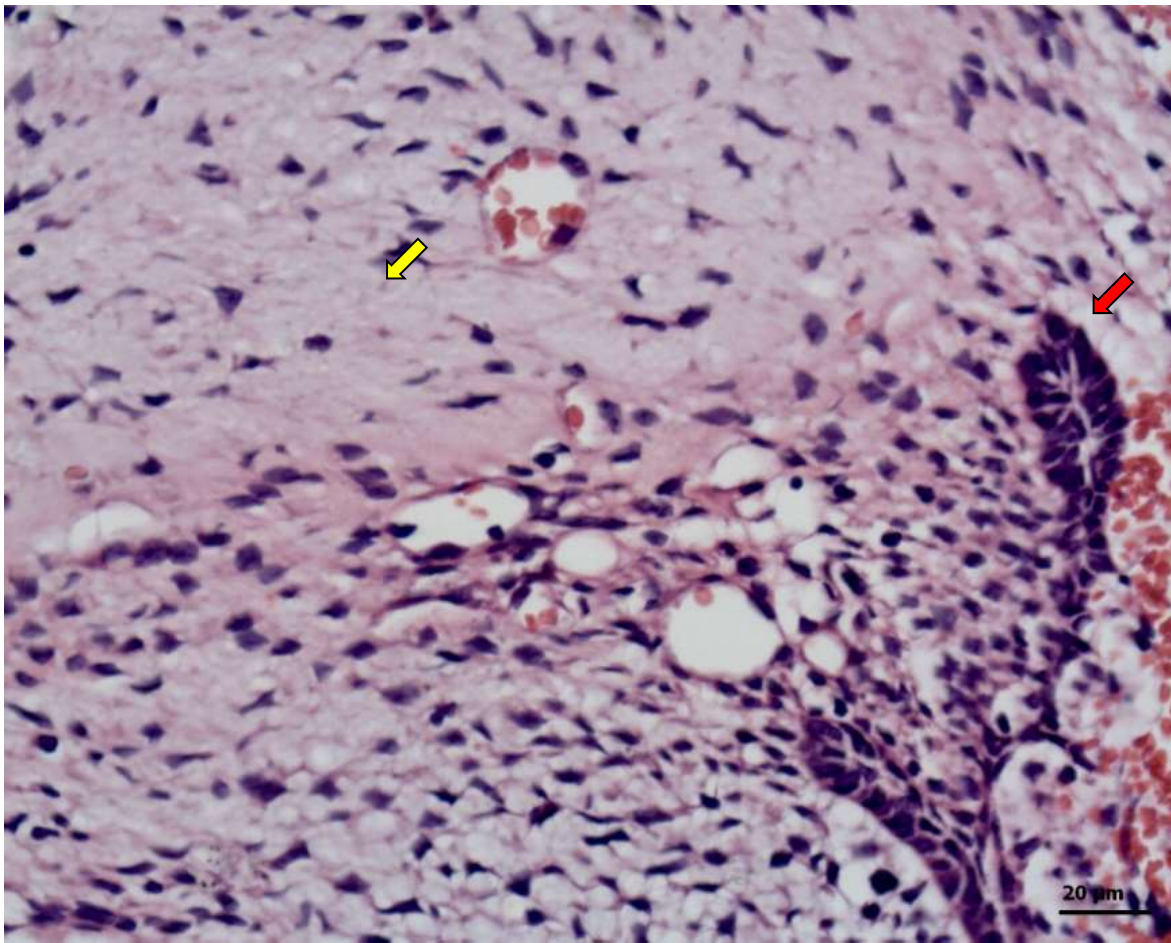


Figura 12 – Nesta lâmina do grupo R é possível observar alteração da alça epitelial (seta vermelha) e a seta amarela aponta a região do folículo mais fibrilar (pobre em células) quando comparado ao grupo controle.

5.2.2 Região odontogênica correspondente a face distal do terceiro molar

No grupo controle dessa região, foi possível observar um maior diâmetro do incisivo do rato. Os odontoblastos apresentavam-se bem organizados, polarizados e íntegros, dispostos em paliçada, constituindo uma só camada de células produzindo pré-dentina. Os ameloblastos estão organizados como células cilíndricas altas e polarizados produzindo a matriz orgânica do esmalte de forma contínua e as células da papila dentária estão dispostas uniformemente.

Nas lâminas dos grupos experimentais, foi possível identificar destruição com visível redução no tamanho do órgão dentário provocada pela falta de produção de esmalte e dentina. Também se verificou alterações nos ameloblastos com falta na produção de matriz do esmalte em algumas regiões, como demonstrado na figura 13.

Presença de um grande vaso que sugere a ruptura de vasos menores formando um único vaso de paredes delgadas e preenchido por hemácias (hemorragia) também foi visualizado em vários cortes dessa região dos grupos experimentais. Vasta desorganização nos odontoblastos e ameloblastos e produção de dentina formando “ilhas de dentina” no interior da papila dentária demonstraram que nessa região as alterações foram mais severas do que no início da região odontogênica.

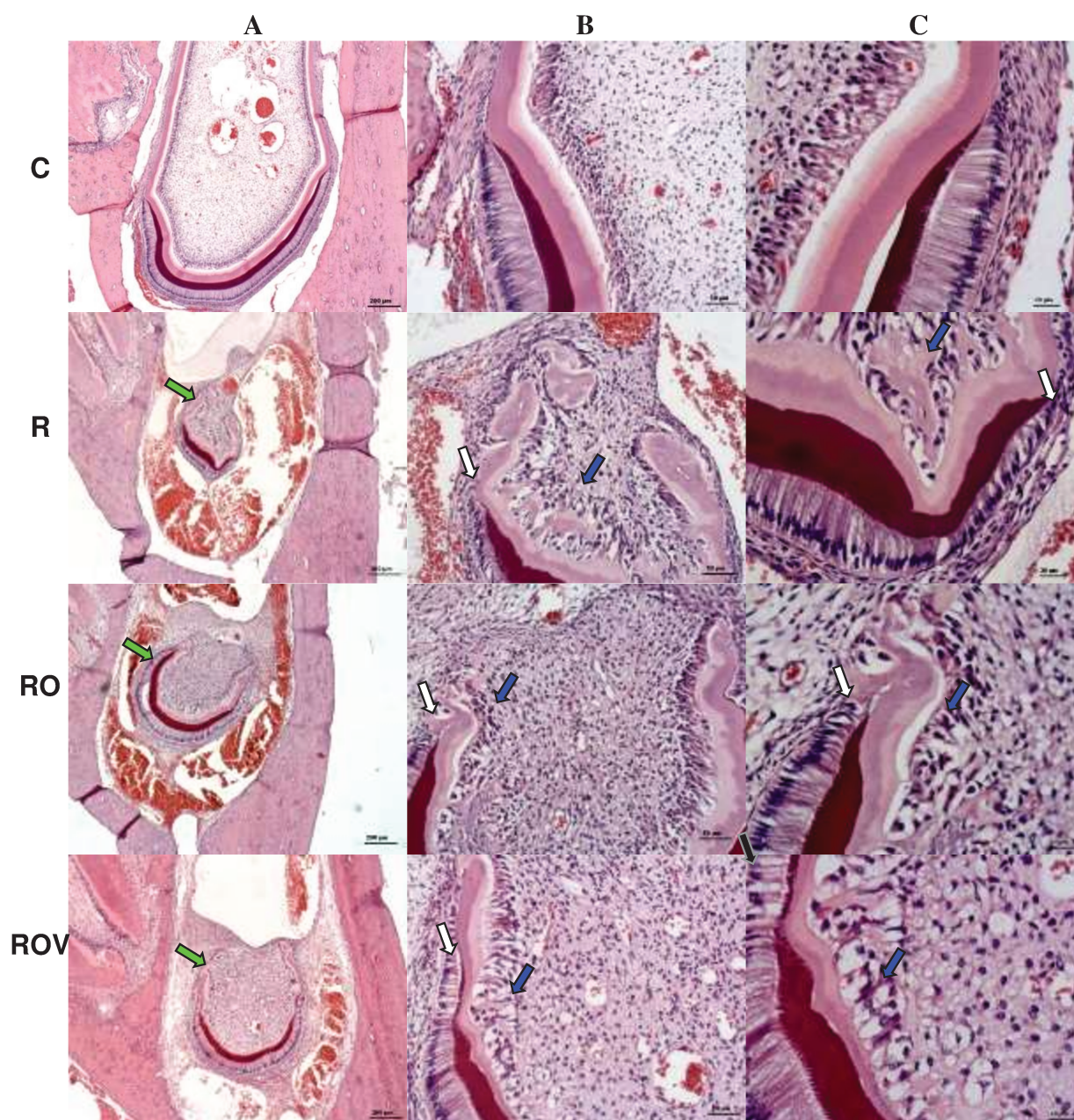


Figura 13 – Cortes histológicos transversais da região odontogênica correspondente à face distal do terceiro molar de incisivos de ratos nos grupos controle (C), radioterapia 15 Gy (R), óleo de oliva 15 Gy (RO) e vitamina E 15 Gy (ROV). A seta verde aponta a visível redução do tamanho do incisivo, a seta branca alterações nos ameloblastos e a seta azul mostra a desorganização dos odontoblastos. Na coluna A o valor da barra corresponde a 200 μ m, na B a 50 μ m e na C a 20 μ m.

5.2.2.1 Grupo Controle (C)

No grupo controle observa-se a organização dos odontoblastos de aspecto colunar, pré-ameloblastos polarizados e as células da papila dentária regularmente distribuídas (Figura 14).

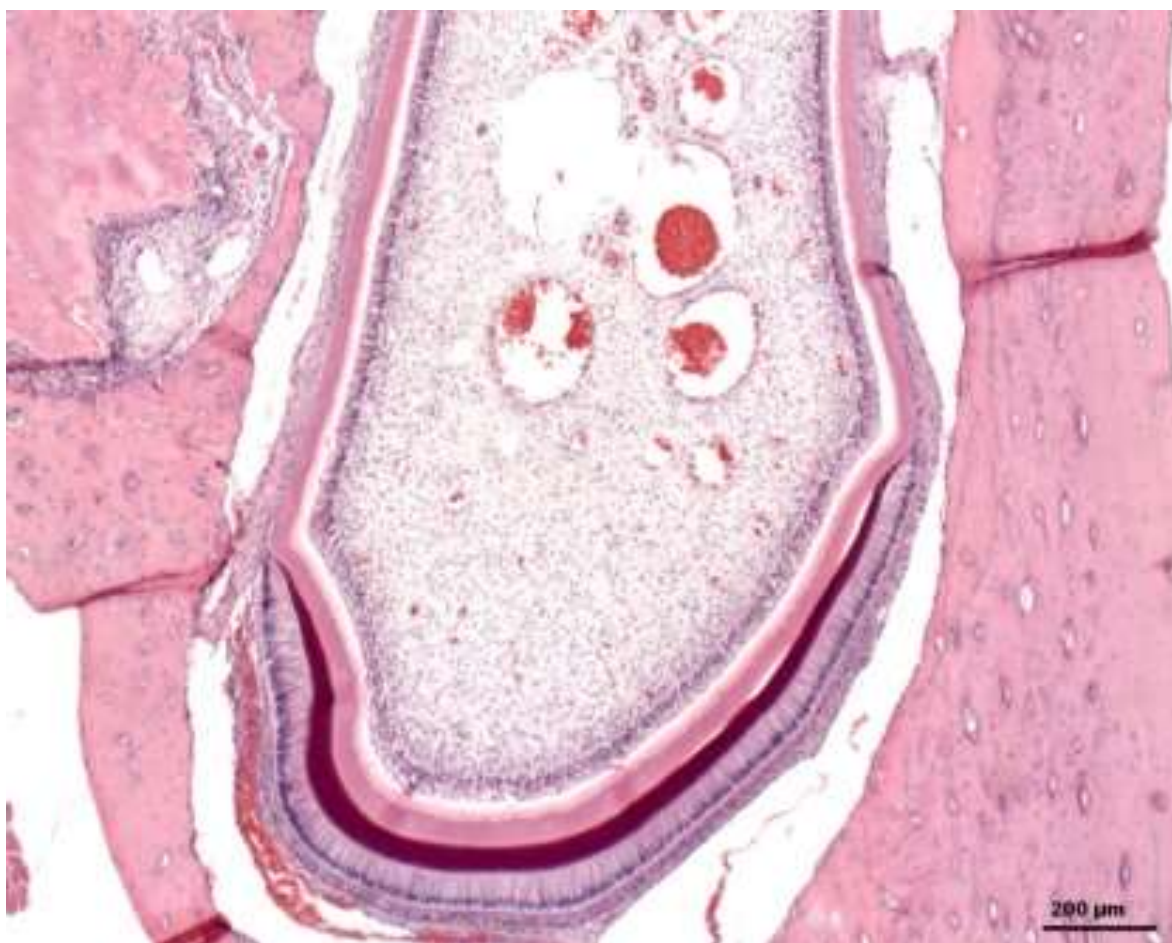


Figura 14 - Lâmina do grupo controle mostrando a formação dentária do incisivo com os ameloblastos e odontoblastos organizados produzindo matriz orgânica do esmalte e pré-dentina respectivamente de forma contínua.

5.2.2.2 Grupo Radioterapia (R)

Esse grupo serviu como referência para avaliar as consequências de uma dose única de 15 Gy de radioterapia na região odontogênica de incisivos de ratos. Foi possível observar que os ameloblastos apresentaram-se irregulares em determinadas regiões (Figura 15).

Os odontoblastos se apresentaram alterados, interferindo na formação de pré-dentina e conseqüente maturação da dentina e, como perdem sua polarização, pareciam produzir pré-dentina em direções aleatórias, formando “ilhas de dentina” (Figuras 15 a 18).

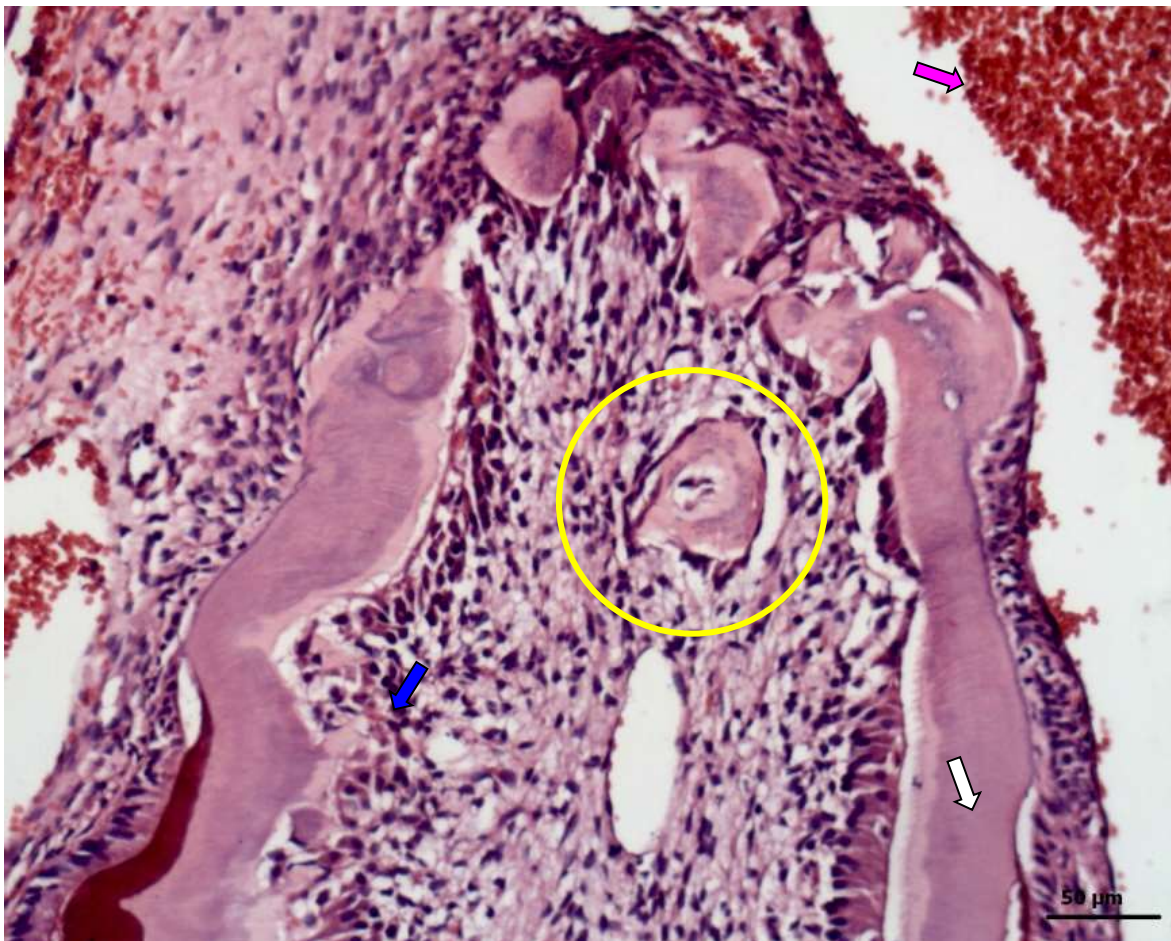


Figura 15 - Corte histológico (grupo R) apresentando alterações nos odontoblastos (seta azul) que produziram pré-dentina em direções aleatórias, formando “ilhas de dentina” (marcação amarela), desorganização dos ameloblastos (seta branca) apontando a falta de produção da matriz orgânica do esmalte e hemorragia na região do folículo (seta rosa).

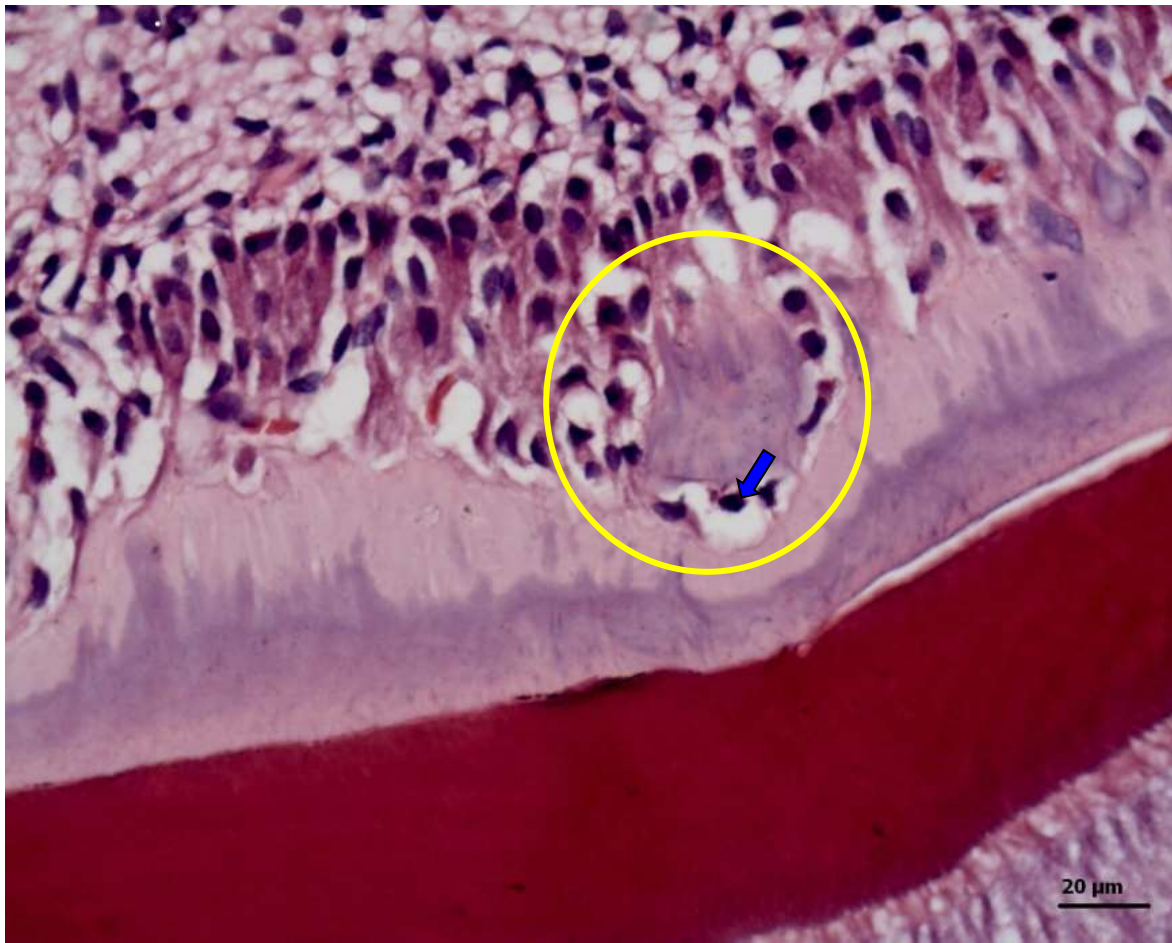


Figura 16 - Corte histológico (grupo R) apresentando alterações nos odontoblastos (seta azul), que produziram pré-dentina em direções aleatórias formando “ilhas de dentina” (marcação amarela).

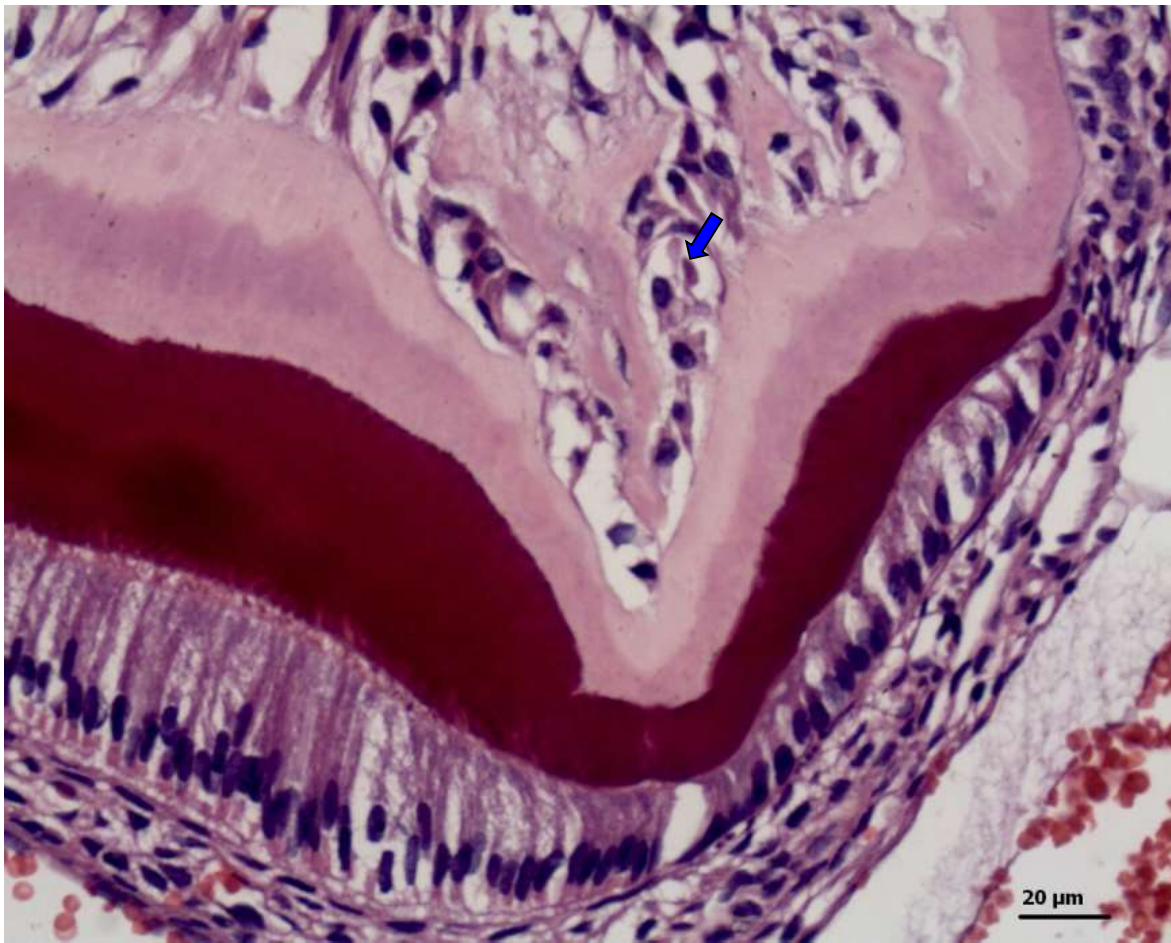


Figura 17 - Corte histológico (grupo R) apresentando alterações nos odontoblastos (seta azul), que produziram pré-dentina em direções aleatórias, formando “ilhas de dentina”.



Figura 18: Cortes histológicos transversais pertencentes ao grupo R que apresentaram destruição do incisivo na região correspondente à face distal do terceiro molar. A seta verde aponta a redução no tamanho do órgão dentário e a azul, a desorganização dos odontoblastos, produzindo pré-dentina em posições aleatórias, formando “ilhas de dentina” (marcação amarela). Hemorragia com grande quantidade de células sanguíneas (seta rosa) fora dos vasos (hemorragia) e formação de um grande vaso ao redor do incisivo (seta preta) também está presente nestes animais, além da alteração dos ameloblastos (seta branca).

5.2.2.3 Grupo Óleo de Oliva (RO)

Nesse grupo, alterações semelhantes ao grupo radioterapia foram observadas em diversos cortes histológicos, como pode ser confirmado nas figuras 19, 20 e 21.

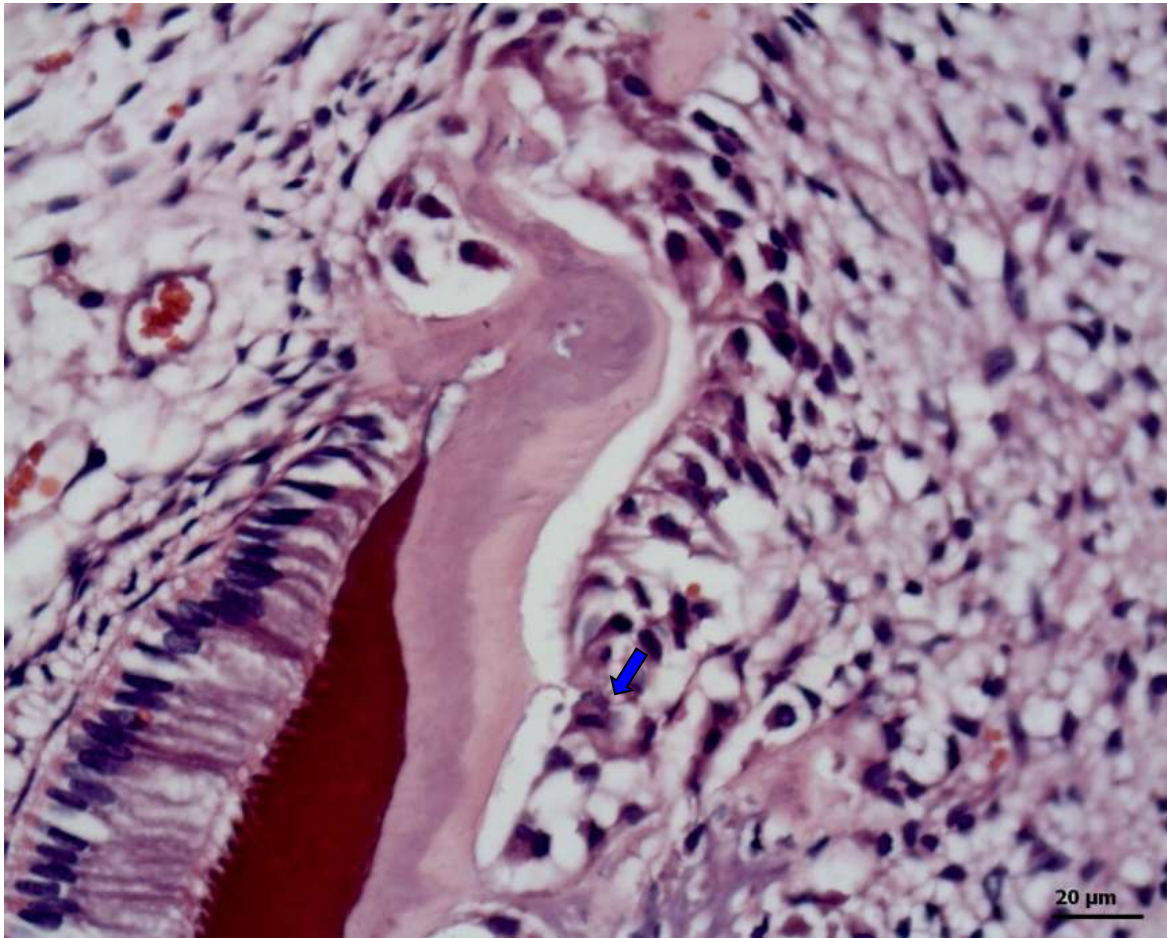


Figura 19 - Corte histológico (grupo RO) apresentando alterações nos odontoblastos (seta azul).

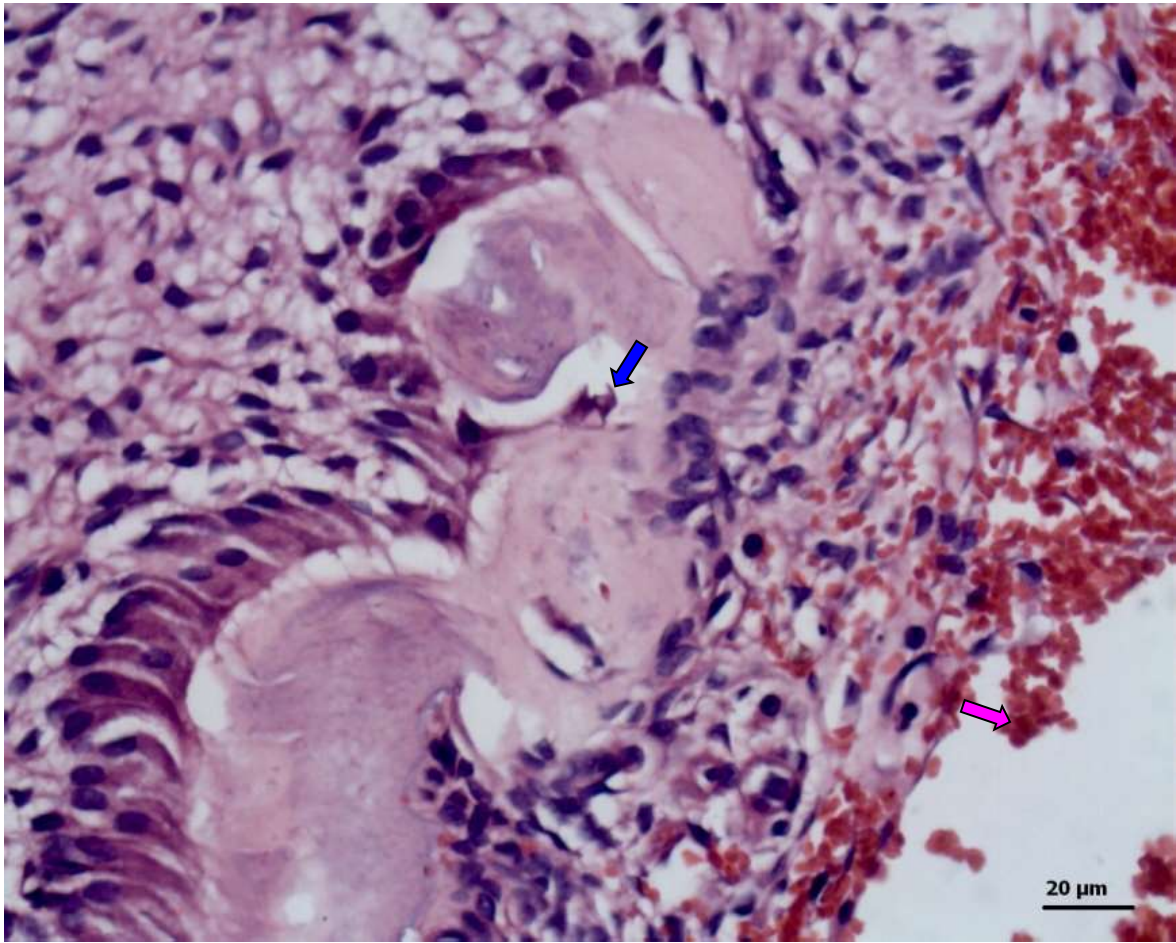


Figura 20 - Corte histológico (grupo RO) apresentando alterações nos odontoblastos (seta azul), que produziram pré-dentina em direções aleatórias, formando “ilhas de dentina” e presença de hemorragia (seta rosa).

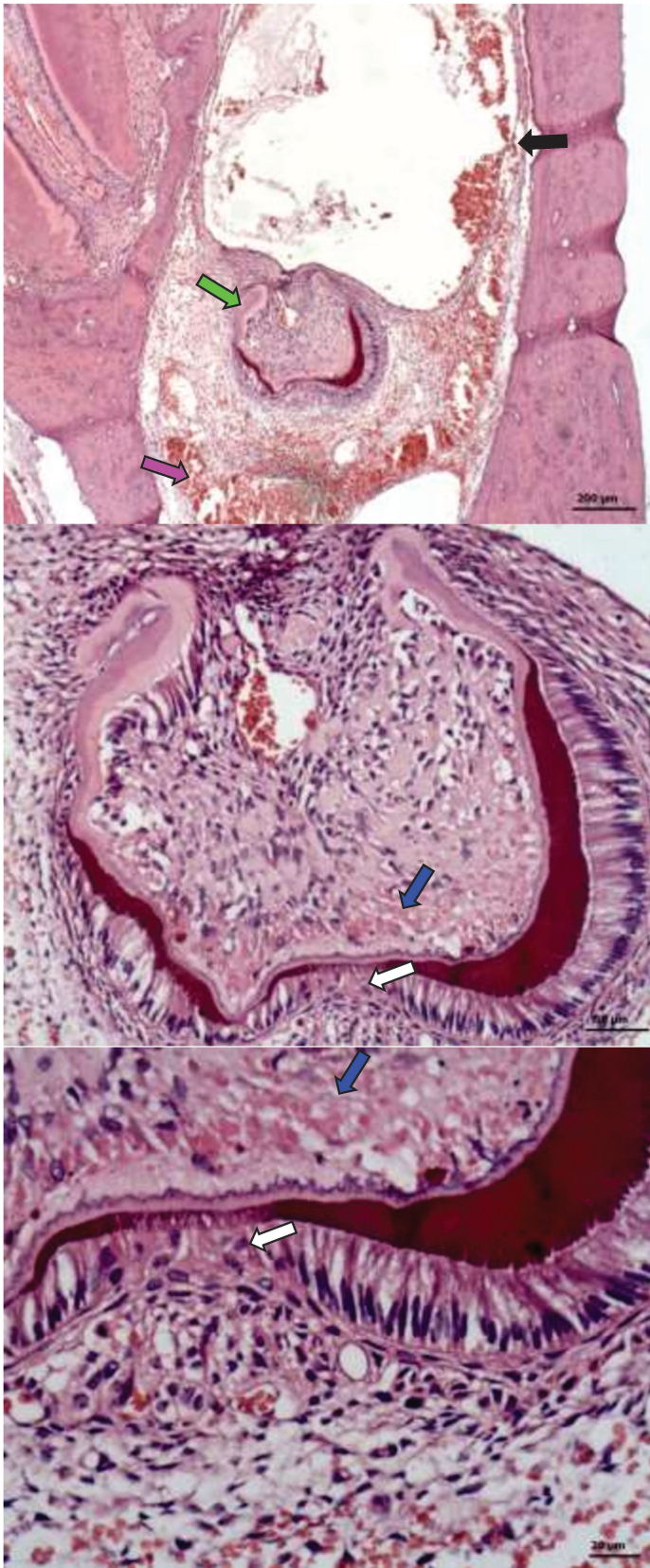


Figura 21 - Lâminas histológicas de cortes transversais pertencentes ao grupo RO que apresentaram enorme destruição do incisivo na região correspondente à face distal do terceiro molar. Pode-se observar uma redução do diâmetro do órgão dentário (seta verde), desorganização dos odontoblastos (seta azul) apresentando produção de pré-dentina em disposições aleatórias, ameloblastos alterados (seta branca), ocorre também uma intensa hemorragia (seta rosa) com quantidade de células sanguíneas fora dos vasos (hemorragia) e formação de um grande vaso ao redor do incisivo (seta preta).

5.2.2.4 Grupo Vitamina E (ROV)

Esse grupo experimental também apresentou alterações significativas causadas pelo efeito da dose única de radiação, similar aos grupos anteriores como demonstram as figuras 22 a 25.

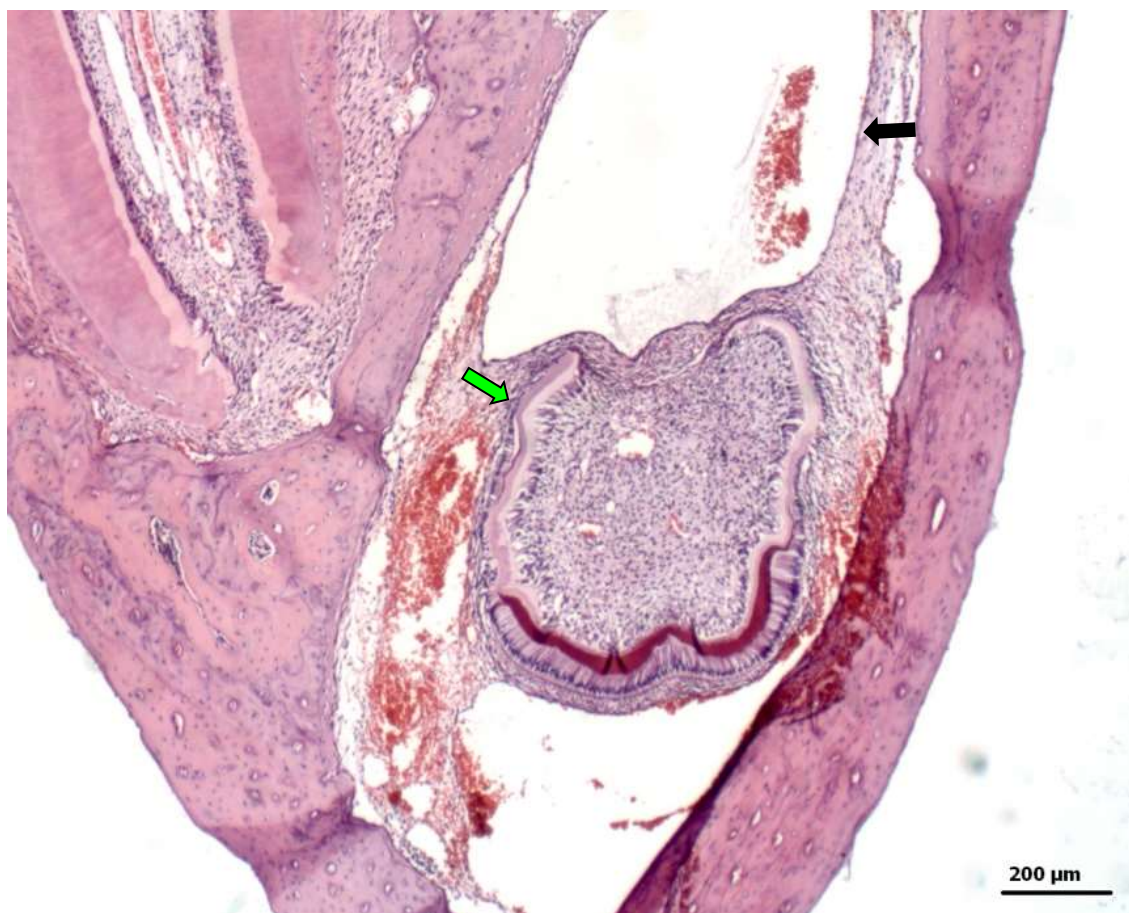


Figura 22 - Corte histológico (grupo ROV) apresentando uma visível alteração de tamanho no incisivo (seta verde) com má-formação dentária e a presença de um grande vaso (seta preta).

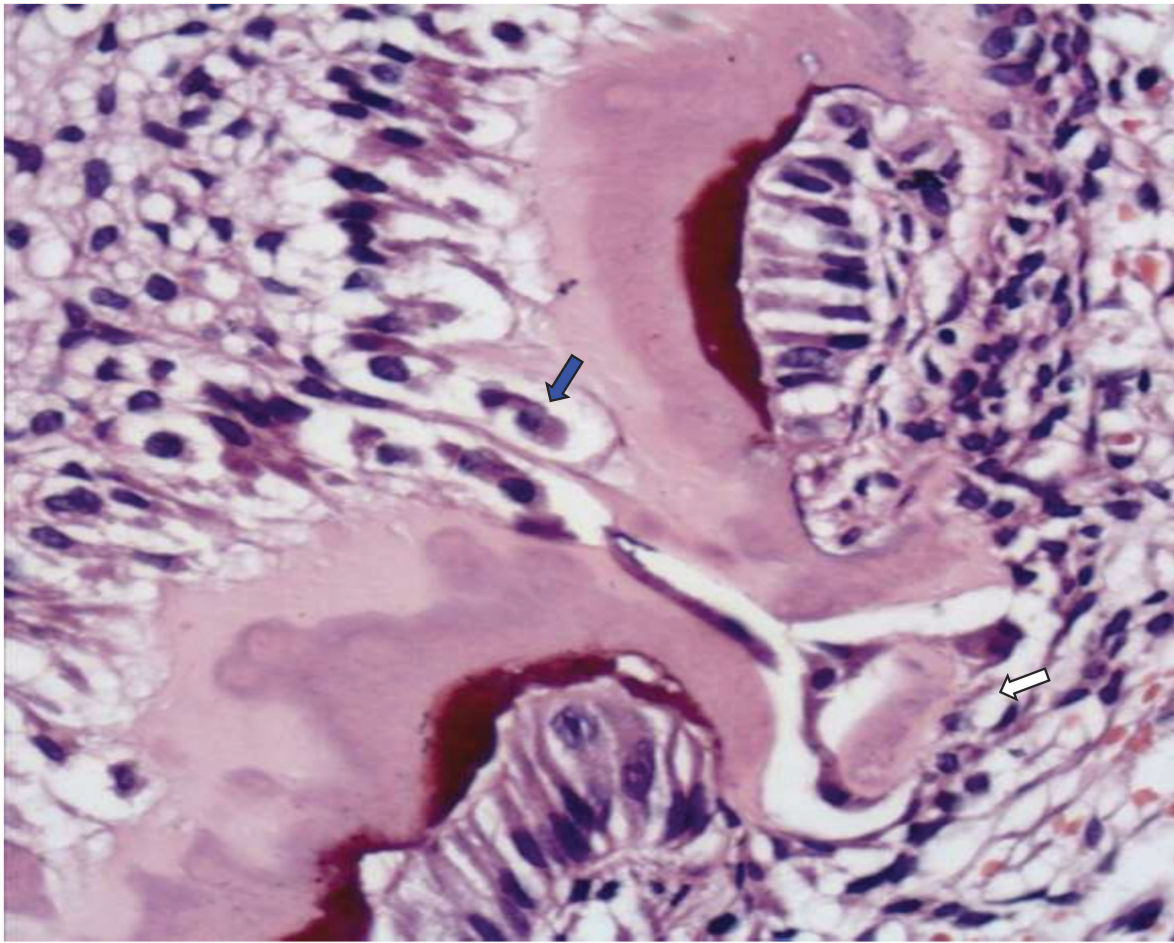


Figura 23 - Corte histológico (grupo ROV) apresentando alterações nos odontoblastos (seta azul) e nos ameloblastos (seta branca).

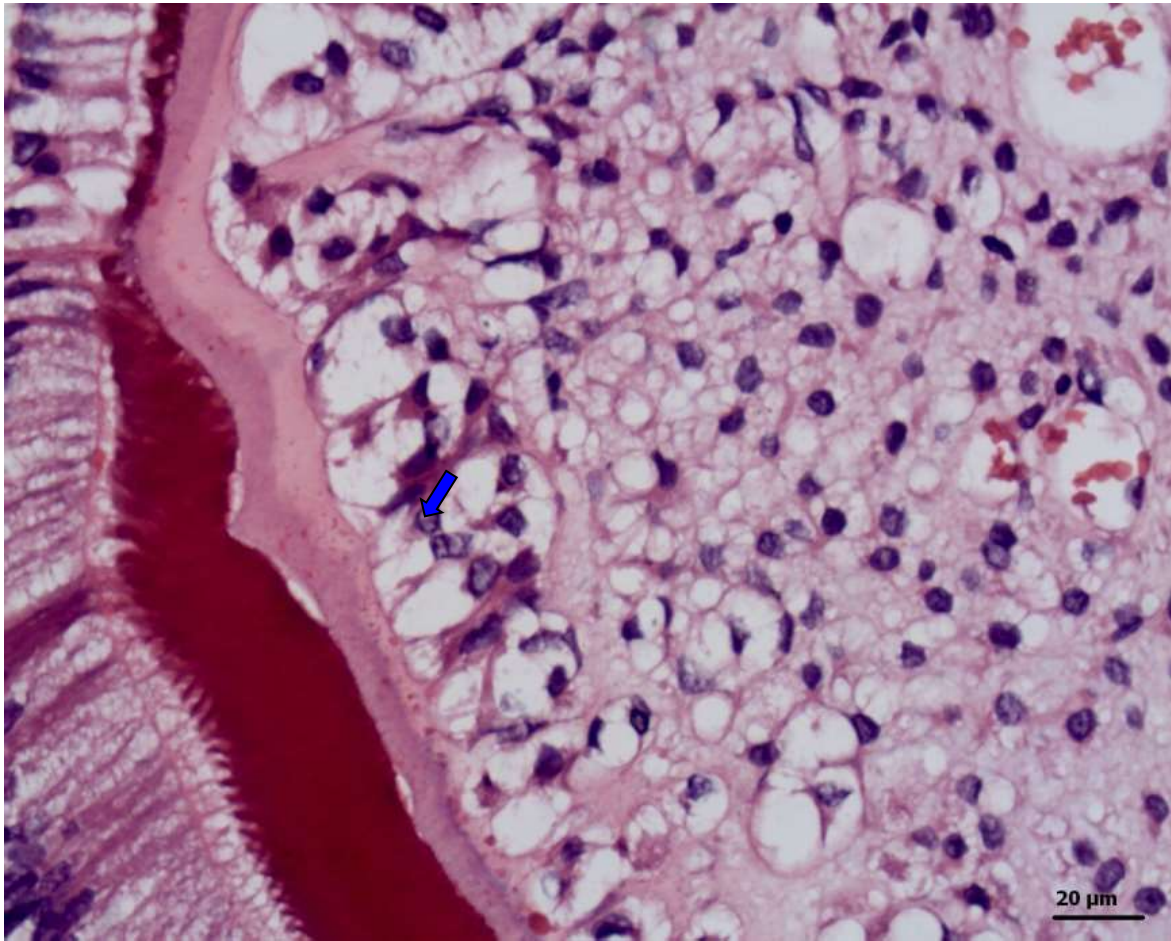


Figura 24 - Corte histológico (grupo ROV) apresentando alterações nos odontoblastos (seta azul) com perda de polarização celular.

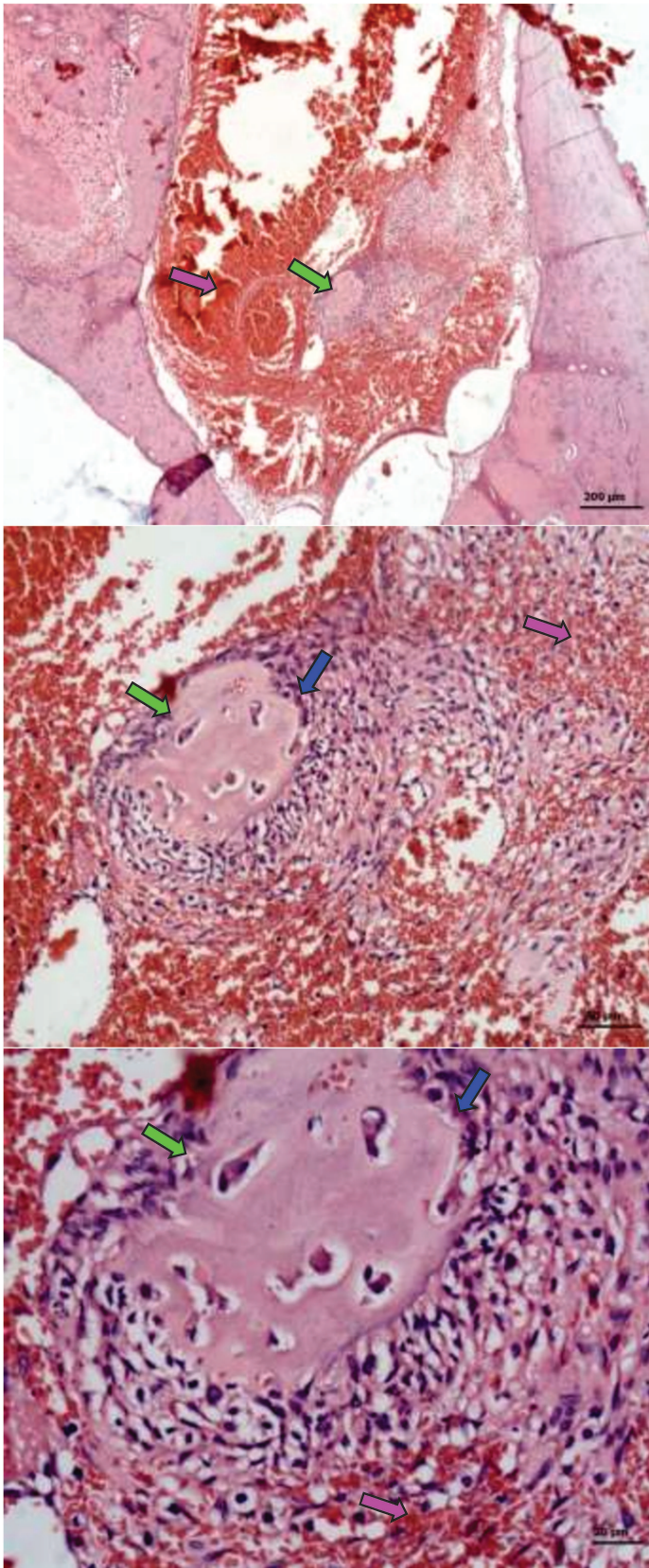


Figura 25 - Lâminas histológicas referentes à cortes transversais de animais pertencentes ao grupo ROV que apresentaram destruição do incisivo na região correspondente à face distal do terceiro molar. Pode-se observar uma redução do diâmetro do órgão dentário (seta verde), desorganização dos odontoblastos (seta azul) apresentando produção de pré-dentina em disposições aleatórias, e hemorragia com células sanguíneas fora dos vasos (seta rosa).

6. DISCUSSÃO

A utilização da radiação ionizante para fins terapêuticos é frequente nas neoplasias malignas, gerando resultados prósperos em pacientes submetidos à radioterapia, podendo essa modalidade de tratamento ser realizada de forma isolada ou associada à cirurgia e/ou quimioterapia. A ação da radiação nos tecidos dentários em desenvolvimento, dependendo da dose, pode causar grandes alterações, em alguns casos impedindo completamente a formação dentária.

No presente trabalho foi utilizada dose única de radiação de 15 Gy. Niehoff *et al.*, em 2008, relataram, após cálculo utilizando um modelo quadrático linear, que uma dose única de 15 Gy equivale à dose fracionada de 54 Gy (27 x 2Gy). Essa dose é um valor médio que muitos profissionais adotam como tratamento em pacientes portadores de câncer na região de cabeça e pescoço. Deste modo, trabalhos que utilizam dose única de radioterapia apresentam um efeito de dose muito maior quando comparado a tratamentos radioterápicos com doses fracionadas.

No dia do sacrifício, constatou-se que os animais que foram submetidos à dose de 15 Gy de radioterapia apresentaram peso inferior, queimaduras e alopecia, quando comparados aos do grupo controle. Estes achados foram semelhantes aos encontrados por English *et al.* (1954) e Niehoff *et al.* (2008).

Neste estudo, escolheu-se utilizar o incisivo de rato, pois esse dente apresenta crescimento contínuo e suas células estão em constante renovação (Merzel & Novaes, 2006), além de serem utilizados como modelo experimental em diversas pesquisas com radioterapia (Dale, 1953; English *et al.*, 1954; Hansen & English, 1957; Coady *et al.*, 1967; Koppang & Strokke, 1969; Horn *et al.*, 1975; Swenney *et al.*, 1977; Pearson & Phelps, 1981; Saad *et al.*, 1991; Niehoff *et al.*, 2008; Araújo, 2010).

Muitos estudos sobre erupção dentária utilizam o incisivo de rato como modelo (Dale, 1953; English *et al.*, 1954; Hansen & English, 1957; Coady *et al.*, 1967; Araújo, 2010), porque várias alterações dos fatores ligados ao movimento eruptivo podem ser

facilmente produzidas nesses dentes, permitindo a observação da resposta dos tecidos envolvidos e da taxa de erupção.

Na região odontogênica ocorrem rápidas divisões celulares e os odontoblastos e ameloblastos iniciam a formação de dentina e esmalte. Devido a essa constante proliferação celular, essa região é considerada bastante radiosensível (Pearson & Phelps, 1981; Merzel & Novaes, 2006). Outra vantagem desse crescimento dentário contínuo é que a irradiação pode ser aplicada em qualquer idade do animal e os ameloblastos e odontoblastos podem ser estudados nas suas diversas fases em um mesmo animal (Koppang & Stokke, 1969).

Na presente pesquisa foi possível visualizar uma redução histológica no diâmetro do incisivo dos grupos experimentais quando comparados ao controle. Sabe-se que inúmeras alterações dentárias podem ocorrer em crianças submetidas a tratamento antineoplásico, podendo ser de forma, número, tamanho ou estrutura (Lopes *et al.*, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2009). Estudando alterações dentárias em crianças submetidas à radioterapia, Kaste *et al.* (1994, 1997, 2009) encontraram dentes ou raízes reduzidas, hipodontia, alteração na erupção dentária, microdontia, taurodontia, xerostomia, esmalte anormal, perda de dentes, gengivite severa e dentes retidos.

A irradiação com 4 Gy *in útero*, durante a fase de formação do germe dentário de molares de ratos, acarreta o aparecimento de alterações no órgão dentário, como a redução no seu tamanho, fusão das cúspides e fraturas coronárias (Manzi, 2005). Alterações na produção de esmalte foram encontradas entre seis e sete dias após dose única de radiação de 16 Gy (Kahn *et al.*, 1979). Horn *et al.*, 1975, relataram que doses únicas de radiação promoveram diferenciação dos ameloblastos e odontoblastos apenas em áreas isoladas, acarretando em aposição de matriz de esmalte e dentina irregulares. Sweeney *et al.*, em 1977, relataram dano acentuado aos ameloblastos e odontoblastos, após doses fracionadas de 48 e 72 Gy. Saad *et al.*, em 1991, reportaram desorganização e degeneração das células da papila dentária, assim como pobre diferenciação e ausência de polarização nas células da superfície da papila e do epitélio interno do esmalte em fetos irradiados com 4 Gy de radiação *in utero* aos doze dias de gestação. Dentre os efeitos da radiação observados nos grupos irradiados experimentais nesta pesquisa pode-se citar na região odontogênica, a desorganização celular, odontoblastos desorganizados, despolarizados

sintetizando dentina em direções diversas ou ausência na síntese, ameloblastos alterados, falta de produção de matriz do esmalte em determinadas regiões.

Várias alterações histológicas foram encontradas nesta pesquisa, resultados que concordam com os de English *et al.* (1954), Boraks *et al.* (2008) e Araújo (2010) relatando alterações graves em diferentes tipos celulares com uma dose de 15 Gy de radioterapia.

No presente trabalho, foi observado que os odontoblastos sofreram alterações estruturais muito mais evidentes do que os ameloblastos. Tal achado corrobora com as afirmações de English & Tullis (1951), Dale (1953) e Sweeney *et al.* (1977) que relataram que ameloblastos são células menos sensíveis a radiação do que os odontoblastos.

No início da região odontogênica dos animais, observou-se poucas alterações nos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Entretanto, na região subsequente, as alterações provocadas pela radioterapia foram bem evidentes nos grupos experimentais, o que sugere que a região odontogênica se recupera no decorrer do tempo, o que também ocorre devido ao movimento eruptivo dentário. Provavelmente em tempos anteriores aos 14 dias do sacrifício, seria possível observar mais alterações nessa região uma vez que na região odontogênica correspondente à face distal do terceiro molar (Região B) as células apresentam-se mais diferenciadas do que no início da região odontogênica (Região A).

Hansen & English (1957) estudaram diversos tempos de sacrifício para avaliar a ação da radioterapia em ratos e constataram que alterações na formação dentária apareciam em cinco dias, após uma semana era possível visualizar início de recuperação da região odontogênica e que em 21 dias esta região era parecida com o controle. Coady *et al.* (1967) adotaram um tempo de sacrifício de uma semana uma vez que alterações na formação dentária já estavam presentes. Com o intuito de avaliar o efeito inicial da radioterapia na região odontogênica, foi escolhido um tempo único de sacrifício de 14 dias após a radioterapia por ser um tempo adequado para se avaliar a taxa de erupção dentária de acordo com Koppang & Stokke (1969). Após avaliar os resultados histológicos sugere-se que pesquisas posteriores sejam realizadas com tempos maiores de sacrifício para constatar se a região odontogênica irá se regenerar totalmente com ou sem o auxílio de radioprotetores, e menores para certificar quando estas alterações histológicas começam a surgir. No presente estudo o início da região odontogênica apresentou alterações mais

discretas quando se compara com a outra região estudada. Talvez ocorram também modificações histológicas na região mais madura do incisivo ou alterações nas funções, metabolismo, polarização celular, fosfatase alcalina ou apoptose.

Trabalhos comprovam que alterações na região odontogênica causam diminuição na taxa de erupção dentária dos incisivos pelo trauma provocado no periodonto relacionado ao esmalte (Merzel *et al.*, 2000a), ressecção da região odontogênica (Merzel *et al.*, 2000b; Merzel *et al.*, 2004), remoção da porção vestibular da região odontogênica (Merzel & Novaes, 2006) e radiação ionizante (Araujo, 2010) indicando que a ação de um agente externo seja trauma, ressecção ou radioterapia podem interferir na morfologia e consequentemente, na taxa de erupção dentária nesse modelo. O desenvolvimento dentário em humanos é muito semelhante ao que ocorre nos ratos. Portanto esse modelo de estudo pode ser utilizado, já que é possível comparar os resultados de pesquisas de dentes de ratos com de humanos.

No presente trabalho foi realizada a mensuração da taxa de erupção dentária em ratos pela metodologia de marcação dos dentes adotada por Coady *et al.* (1967) e Araújo (2010).

Ubios *et al.* (1992) identificaram atraso ou falha na erupção dos molares inferiores e diminuição da taxa de erupção em molares de ratos submetidos a radiação X (20 Gy) e sacrificados com 30 e 60 dias. Coady *et al.*, em 1967, que, estudando uma dose cumulativa de 12 e 24 Gy, não observaram diferenças na taxa de erupção dentária nem efeitos sobre a taxa de renovação celular e alterações histológicas nos incisivos, porém esses autores utilizaram dose fracionada de radioterapia e adotaram o tempo de sacrifício de 7 dias. Esse resultado difere dos encontrados nesta pesquisa, pois foi constatada diferença estatística na taxa de erupção dentária a partir do sexto dia após a radioterapia, aparente redução na população celular na região do folículo adjacente à face lingual do incisivo, quando comparado ao grupo controle no início da região odontogênica e alterações na formação da alça epitelial do órgão dentário independente do tratamento aplicado nesses. Esta diferença pode ser justificada, pois a pesquisa de Coady *et al.* adotou doses fracionadas de radiação gama com tempo de sacrifício de sete dias no incisivo superior,

nesta pesquisa foi utilizada dose única de radiação X com tempo de sacrifício de quatorze dias em incisivos inferiores.

Os padrões de diversos tipos de alterações decorrentes da radioterapia são semelhantes entre as espécies, como ratos (Dale, 1953; English *et al.*, 1954; Hansen & English, 1957; Coady *et al.*, 1967; Sweeney *et al.*, 1977; Ubios *et al.*, 1992; Manzi, 2005; Cherdyntseva *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006; Boraks *et al.*, 2008; Niehoff *et al.*, 2008), camundongos (Kulkarni *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012), porcos (English & Tullis, 1951) e cachorros (Lee *et al.*, 1989).

Diversos estudos demonstram que as alterações geradas pela radioterapia podem ser evitadas ou minimizadas com a utilização de substâncias denominadas radioprotetoras. Visto que a formação dentária ocorre nos primeiros anos de vida e ainda é grande o número de crianças com neoplasias malignas que necessitam da radioterapia como tratamento, é importante estudar substâncias que evitem ou, pelo menos, minimizem esse dano causado pela radiação na formação dos dentes.

Investiga-se a eficácia radioprotetora do α -tocoferol e suas abordagens nutricionais de radioproteção, visto que sua principal ação é a antioxidante, sua atuação lipossolúvel, que seu mecanismo de ação é proteger as membranas fosfolipídicas, inibindo a peroxidação lipídica, auxiliando na regeneração tecidual e combatendo os radicais livres (Wu & Corft, 2007). Vários trabalhos adotaram a vitamina E como opção de estudo de sua atividade radioprotetora (Rostock *et al.*, 1980; Felemovicius *et al.*, 1995; Manzi *et al.*, 2003; Cherdyntseva *et al.*, 2005; Koizumi *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006; Chitra & Shiamala Devi, 2008; Sezen *et al.*, 2008; Wambi *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009, 2010; Kulkarni *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012). Portanto, essa substância pode ser adotada como opção na pesquisa do tratamento radioprotetor no desenvolvimento dentário.

Existem algumas formas de aplicação da vitamina E no animal, dentre elas estão a intraperitoneal (Rostock *et al.*, 1980; Manzi *et al.*, 2003; Cherdyntseva *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006), tópica (Felemovicius *et al.*, 1995; Pedrelli *et al.*, 2011) e oral (Koizumi *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006; Wambi *et al.*, 2008). Com a finalidade de simular uma condição real nesta pesquisa, a qual poderia ser utilizada posteriormente em humanos, foi adotada a aplicação oral nos animais, que ocorreu utilizando uma agulha para gavagem,

conectada a uma seringa de 3 ml, permitindo que as soluções fossem depositadas diretamente no estômago.

Nesta pesquisa, aplicou-se nos animais uma dose de 360 mg/kg de vitamina E baseada na pesquisa de Ramos *et al.* (2006) que constataram radioproteção com esta dose em glândulas salivares. Esta substância foi aplicada durante 60, 36 e 12 horas antes e após da radioterapia de acordo com Prasad *et al.* (2002) que recomendaram a administração diária em menos de 48 horas antes da irradiação, estes ainda salientaram a importância da permanência de antioxidantes pós-irradiação a fim de reduzir a taxa de reparo de células tumorais que sofreram danos pela radiação. Shen *et al.* (2010) usaram 350 mg/kg; Singh *et al.* (2006), Singh *et al.* (2009, 2010) e Singh *et al.* (2012) utilizaram 400 mg/kg; Sezen *et al.* (2008) e Lindshield *et al.* (2010) uma dose de 200 mg/kg.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, decorrentes da avaliação da taxa de erupção dentária, mostraram que houve diferença estatística dos grupos experimentais Radioterapia e Óleo de oliva seis dias após a radioterapia, já o grupo Vitamina E apresentou essa diferença apenas dez dias após a radioterapia quando comparados com o grupo controle. Essa diferença pode sugerir uma tendência de radioproteção nesse grupo quando comparados com os outros grupos experimentais.

Diferentes trabalhos relataram o efeito radioprotetor da vitamina E na prevenção de alterações celulares (Prasad *et al.*, 2002; Koizumi *et al.*, 2005), no reparo tecidual (Manzi *et al.*, 2003), nas funções das glândulas salivares (Ramos *et al.*, 2006; Chitra & Shiamala Devi, 2008), no cérebro e retina (Sezen *et al.*, 2008), nas células hematopoiéticas (Wambi *et al.*, 2008; Kulkarni *et al.*, 2010), nas células mielóides (Singh *et al.*, 2009), nas células gastrointestinais (Singh *et al.*, 2012) e na sobrevida (Wambi *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009).

O trabalho de Rostock *et al.* (1980) demonstrou que não houve nenhum tipo de proteção histológica dos pulmões e coração em ratos submetidos a doses de 15 e 20 Gy de radioterapia.

Radioproteção parcial também foi verificada por Felemovicius *et al.* (1995) avaliando células do intestino e por Cherdyntseva *et al.* (2005) na medula óssea e sangue periférico de células nucleadas. Sugerem-se pesquisas posteriores para verificar se existe

uma completa ação radioprotetora na taxa de erupção dentária com doses mais elevadas de vitamina E.

Nesta pesquisa, foi incluído o grupo RO, o qual foi constituído por animais que foram submetidos à dose única de radiação X de 15 Gy e receberam 4 ml/kg corpóreo de óleo de oliva. Esse óleo foi adotado em virtude da necessidade de utilização de um veículo para aplicar a vitamina E via oral nos animais, para confirmar que esse não seria um possível radioprotetor. Outros autores também utilizaram o óleo de oliva como veículo na aplicação da vitamina E, tais como Manzi *et al.* (2003) e Ramos *et al.* (2006).

Apesar de que neste trabalho não foi possível visualizar uma proteção da vitamina E microscópica pelas alterações provocadas pela radioterapia, observamos uma tendência à proteção na taxa de erupção dentária. Entretanto, a vitamina E poderia ser utilizada como um agente radioprotetor uma vez que é uma substância antioxidante, facilmente encontrada na natureza e com a vantagem de não apresentar efeitos tóxicos, permitindo assim a sua utilização sem preocupações.

Assim, associando esses achados à prática clínica, quanto mais jovem um paciente for submetido à radioterapia maior será o grau e severidade das lesões dentárias encontradas. Ainda é importante salientar que existem substâncias denominadas radioprotetoras que servem para proteger contra os efeitos nocivos da radiação.

7. CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais utilizadas, conclui-se que, apesar de histologicamente não haver evidência de proteção, a vitamina E demonstrou leve ação radioprotetora na taxa de erupção dentária em ratos.

REFERÊNCIAS*

Albuquerque RA, Moraes VVL, Sobral APV. Protocolo de atendimento odontológico a pacientes oncológicos pediátricos – revisão da literatura. Rev Odont UNESP. 2007; 36 (3): 275-80.

Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 1. Aust Dent J. 2001a; 46 (2): 88-94.

Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 2. Aust Dent J. 2001b; 46 (3): 174-82.

Araujo AMM. Efeito da radioterapia na taxa de erupção e na morfologia da região odontogênica dos incisivos de ratos [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010.

Birringer M. Analysis of vitamin E metabolites in biological specimen. Mol Nutr Food Res. 2010; 54: 588-98.

Boraks G, Tampelini FS, Pereira KF, Chopard RP. Effect of Ionizing Radiation on Rat Parotid Gland. Braz Dent J. 2008; 19 (1): 73-6.

Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. FASEB J. 1999; 13: 1145-55.

Campos VE, Vasconcelos FAF, Prado EFG, Cristófani LM, Vizeu HWM. Alterações do desenvolvimento dentofacial em pacientes da oncopediatria. J Bras Clin Odontol Integr. 2004; 8 (44): 101-4.

Cardoso MFA, Novikoff S, Tresso A, Segreto RA, Cervantes O. Prevenção e controle das sequelas bucais em paciente irradiados por tumores de cabeça e pescoço. Radiol Bras. 2005; 38 (2): 107-15.

Cherdyntseva N, Shishkina A, Butorin I, Murase H, Gervas P, Kagiya TV. Effect of Tocopherol-monoglucoside (TMG), a Water-soluble Glycosylated Derivate of Vitamin E, on Hematopoietic Recovery in Irradiated Mice. J Radiat Res. 2005; 46: 37-41.

Chitra S, Shiamala Devi CS. Effects of radiation and a-tocopherol on saliva flow rate, amylase activity, total protein and electrolyte levels in oral cavity cancer. Indian J Dent Res. 2008; 19 (3): 213-8.

Coady JM, Santangelo MV, Toto PD. Gamma-Irradiated Mouse Incisor. J Dent Res. 1967; 46 (4): 681-5.

- Dale PP. The Effect of X-Ray Irradiation on the Rat Incisor. *J Dent Res.* 1953; 32 (1): 117-25.
- Engin KN. Alpha-tocopherol: looking beyond antioxidant. *Molecular Vision.* 2009; 15: 855-60.
- English JA, Schlack CA, Ellinger F. Oral Manifestations of Ionizing Radiation. II. Effect of 200 KV. x-ray on rat incisor teeth when administered locally to the head in the 1.500 R. dose range. *J Dent Res.* 1954; 33 (3): 377-88.
- English JA, Tullis JL. Oral Manifestations of Ionizing Radiation. I. Oral lesions and effect on developing teeth of swine exposed to 2000 K.V. total body X-ray irradiation. *J Dent Res.* 1951; 30 (1): 33-52.
- Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: Inca, 2011.
- Felemovicius I, Bonsack ME, Baptista ML, Delaney JP. Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol). *Annals of Surgery.* 1995; 222 (4): 504-10.
- Hansen LS, English JA. Histologic changes in the incisor teeth of rats serially sacrificed after receiving 1,500 R of 200 KV. x-ray irradiation. *J Dent Res.* 1957; 36 (3): 417-31
- Himmelfarb J, Kane J, McMonagle E, Zaltas E, Bobzin S, Boddupalli S, Phinney S, Miller G. Alpha and gamma tocopherol metabolism in healthy subjects and patients with end-stage renal disease. *Kidney International.* 2003; 64: 978-91.
- Hong CHL, Napeñas JJ, Hodgson BD, Stokman MA, Mathers-Stauffer F, Elting LS, *et al.* A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. *Support Care Cancer.* 2010.
- Horn Y, Maikitzu A, Ulmanky M. Effect of single versus fractionated doses of x-radiation on incisor rats. *J Dent Res.* 1975; 54(2): 328-88.
- Jham BC, Reis PM, Miranda EL, Lopes RC, Carvalho AL, Scheper MA, *et al.* Oral health status of 207 head and neck cancer patients before, during and after radiotherapy. *Clin Oral Invest.* 2008; 12: 19-24.
- Kaste SC, Hopkins KP, Jenkins III JJ. Abnormal odontogenesis in Children Treated with Radiation and Chemotherapy: Imaging findings. *AJR.* 1994; 162: 1407-11.
- Kaste SC, Hopkins KP, Jones D, Crom D, Greenwald CA, Santana VM. Dental abnormalities in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1997; 11: 792-6.

- Kaste SC, Goodman P, Leisenring W, Stovall M, Hayashi R, Yeazel M, *et al.* Impact of Radiation and Chemotherapy on Risk of Dental Abnormalities. *Cancer*. 2009; 5817-27.
- Khan MA, Gartner LP, Hiatt JL, Provenza DV. Sensitivity of mouse molar tooth germs to x-ray irradiation in vitro. *J Biol Buccale*. 1979; 7(3): 211-4.
- Koizumi M, Nishimura T, Kagiya T. Clinical trial of adverse effect inhibition with glucosides of vitamin C and vitamin E in radiotherapy and chemotherapy. *J Cancer Res Ther*. 2005; 1 (4): 239.
- Koppang HS, Stokke T. Further studies on the radiosensitivity of the rat incisor. The relative radiosensitivity of superior and inferior incisors, and of labial and lingual odontogenic elements. *Odontol Tidskr*. 1969; 77(1): 47-61.
- Kulkarni S, Ghosh SP, Satyamitra M, Mog S, Hieber K, Romanyukha L, Gambles k, *et al.* Gamma-tocotrienol protects hematopoietic stem and progenitor cells in mice after total-body irradiation. *Radiat Res*. 2010; 173 (6): 738-47.
- Langland OE, Langlais RP. *Princípios do Diagnóstico por Imagem em Odontologia*. São Paulo: Ed Santos; 2002.
- Lee AC, Angleton GM, Benjamin SA. Hypodontia in the Beagle after perinatal whole-body ^{60}Co γ irradiation. *Radiat Res*. 1989; 118: 467-75.
- Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Néel D, Lagrost L. Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is α -tocopherol in lipid rafts on oar in the lifeboat? *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54: 631-40.
- Lesot H, Brook AH. Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol*. 2009; 54S: S25-S33.
- Lindshield BL, Ford NA, Canene-Adams K, Diamond AM, Walling MA, Erdman Jr JW. Selenium, but Not Lycopene or Vitamin E, Decreases Growth of Transplantable Dunning R3327-H Rat Prostate Tumors. *PLoS ONE*. 2010; 5 (4): 1-9.
- Lôbo ALG, Martins GB. Consequências da Radioterapia na Região de Cabeça e Pescoço: Uma Revisão da Literatura. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac*. 2009; 50 (4): 251-5.
- Lopes NNF, Petrilli AS, Caran EMM, França CM, Chilvarquer I, Lederman H. Dental abnormalities in children submitted to antineoplastic therapy. *J Dent Child*. 2006; 73 (3): 140-5.

Manzi FR, Bóscolo FN, Almeida SM, Tuji FM. Morphological study of the radioprotective effect of vitamin E (dl-alpha-tocopheril) in tissue reparation in rats. *Radiol bras.* 2003; 36 (6): 367-71.

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

Marks SC, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 1996; 245: 374-93.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. The effects of local trauma to the enamel-related periodontal tissues in the eruption of the rat incisor. *Arch Oral Biol.* 2000a; 45: 323-33.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. A histological study of root-resects and root-transected rat incisor when eruption ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. *Arch Oral Biol.* 2000b; 45 (2): 315-22.

Merzel J, Nunes SF, Novaes PD. The effect of partial damage to the enamel-related periodontium combined with root resection on eruption of the rat incisor eruption. *Arch Oral Biol.* 2004; 49 (3): 209-16.

Merzel J, Novaes PD. Development of functional dentin incisors after a partial resection of the odontogênica organ of rat incisors. *Arch Oral Biol.* 2006; 51 (10): 825-35.

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

Ohshima H, Nakasone N, Hashimoto E, Sakai H, Nakakura-Ohshima K, Harada H. The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 153-7.

Otmani N. Oral and Maxillofacial Side Effects of Radiation Therapy on Children. *JCDA.* 2007; 73 (3): 257-61.

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

Pedrelli VF, Lauriola MM, Pigatto PD. Clinical evaluation of photoprotective effect by a topical antioxidants combination (tocopherols and tocotrienols). *JEADV.* 2011: 1-5.

Prasad KN, Cole WC, Kumar B, Che Prasad K. Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy. *Cancer Treat Rev.* 2002; 28: 79-91.

- Ramos FMM, Pontual MLA, Almeida SM, Bóscolo FN, Tabchury CPM, Novaes PD. Evaluation of radioprotective effect of vitamin E in salivary dysfunction in irradiated rats. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 96-101.
- Rosales ACMN, Esteves SCB, Jorge J, Almeida OP, Lopes MA. Dental needs in Brazilian patients subjected to head and neck radiotherapy. *Braz Dent J.* 2009; 20 (1): 74-7.
- Rostock RA, Stryker JA, Abt AB. Evaluation of High-Dose Vitamin E as a Radioprotective Agent. *Radiol.* 1980; 136: 763-6.
- Saad AY, Abdelazim AA, el-Khashab MM, Mansour MA. Effects of gamma radiation on incisor development of the prenatal albino mouse. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20(8): 385-8.
- Schour I, Massler M. The Teeth. In: *The Rat in Laboratory Investigation*. New York: Ed Hafner Publishing Company Inc; 1971.
- Sezen O, Ertekin MV, Demircan B, Karslıoğlu Y, Erdoğan F, Koçer Y, *et al.* Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced brain and retinal damages. *Neurosurg Rev.* 2008; 31: 205-13.
- Shen XH, Tang QY, Huang J, Cai W. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *EBM.* 2010; 235: 47-51.
- Singh VK, Shafran RL, Jackson III WE, Seed TM, Kumar KS. Induction of cytokines by radioprotective tocopherol analogs. *Exp Mol Pathol.* 2006; 81: 55-61.
- Singh VK, Brown DS, Kao TC. Tocopherol succinate: A promising radiation countermeasure. *Int Immunopharmacol.* 2009; 9: 1423-30.
- Singh VK, Brown DS, Kao TC. Alpha-tocopherol succinate protects mice from gamma-radiation by induction of granulocyte-colony stimulating factor. *Int J Radiat Biol.* 2010; 86 (1): 12-21.
- Singh PK, Wise SY, Ducey EJ, Fatanmi OO, Elliott TB, Singh VK. α Tocopherol succinate protects mice against radiation-induced gastrointestinal injury. *Radiat Res.* 2012; 177 (2): 133-45.
- Sweeney WT, Elzay RP, Levitt SH. Histologic Effect of Fractionated Doses of Selectively Applied ^{60}Co Irradiation on the Teeth of Albino Rats. *J Dent Res.* 1977; 56 (11): 1403-7.
- Takada T, Suzuki H. Molecular mechanisms of membrane transport of vitamin E. *Mol Nutri Food Res.* 2010; 54: 616-22.

- Ten Cate AR. Desenvolvimento do dente e seus tecidos de suporte. In: Ten Cate R. *Histologia Bucal: desenvolvimento, estrutura e função*. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. P. 76-100.
- Ubios AM, Piloni MJ, Cabrini RL. Mandibular growth and tooth eruption after localized x-radiation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992; 50 (2): 153-6.
- Uchida T, Ichikawa T, Abe C, Yamashita K, Ikeda S. Dietary Sesame Seed Decreases Urinary Excretion of α - and γ -Tocopherol Metabolites in Rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2007; 53: 372-6.
- Vasconcelos, NPS, Caran EMM, Lee ML, Lopes NNF, Weiler RME. Dental maturity in children with acute lymphoblastic leukemia after cancer therapy. *Forensic Sci Int*. 2009; 184: 10-4.
- Wambi C, Sanzari J, Wan XS, Nuth M, Davis J, Ying-Hui Ko, Sayers CM, Baran M, Ware JH, Kennedy AR. Dietary antioxidants protect hematopoietic cells and improve animal survival after total-body irradiation. *Radiat Res*. 2008; 169, 384-96.
- Wu JH, Croft KD. Vitamin E metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007; 28: 437-52.

ANEXO



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp

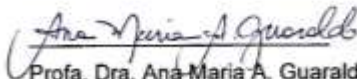
CERTIFICADO

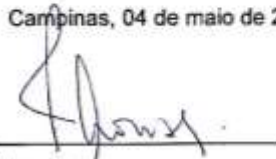
Certificamos que o Protocolo nº 1843-1, sobre "Avaliação da taxa de erupção dental em ratos pelo uso de radioprotetor", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes / Amanda Maria Medeiros de Araujo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em 04 de maio de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1843-1, entitled "Evaluation of the rate of tooth eruption in rats by use of radioprotective", 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 May 4, 2009.

Campinas, 04 de maio de 2009.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEE/Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comis@unicamp.br
<http://www.b.unicamp.br/cee/>