

Flávia Maria de Moraes Ramos Perez  
Cirurgiã-Dentista

**EFEITO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA  
FORMAÇÃO DA MATRIZ ORGÂNICA DO ESMALTE  
DENTÁRIO**

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

Orientador: Prof. Dra. Solange Maria de Almeida

Piracicaba  
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Sueli Ferreira Julio de Oliveira – CRB-8ª. / 2380

R147e Ramos-Perez, Flávia Maria de Moraes.  
Efeito da radiação ionizante na formação da matriz orgânica do esmalte dentário. / Flávia Maria de Moraes Ramos-Perez. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Radiação ionizante. 2. Ameloblastos. 3. Ultraestrutura. 4. Birrefringência. I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(sfjo/fop)

Título em Inglês: Effect of ionizing radiation in dental enamel organic matrix formation

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

Ultrastructure. 4. Birefringence

Área de Concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutor em Radiologia Odontológica

Banca Examinadora: Solange Maria de Almeida, Frab Norberto Bóscolo, Pedro Duarte Novaes, Gulnara Scaf, Israel Chilvarquer

Data da Defesa: 09-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Radiologia Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 09 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata FLÁVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ aprovada.

PROFa. DRa. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

PROFa. DRa. GULNARA SCAF

PROF. DR. ISRAEL CHILVARQUER

PROF. DR. FRAB NORBERTO BOSCOLO

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

2009 5 3 7

## *Dedico este trabalho*

*A Deus, meu Pai Eterno, presença constante em minha vida, que caminha ao meu lado me mostrando o caminho da bondade e do amor.*

*Nossa Senhora, minha Mãe iluminada, que intercede por mim junto ao Pai.*

*Aos meus queridos pais, João e Gislaíne, por se doarem aos seus filhos e renunciarem aos próprios sonhos, para que pudéssemos realizar os nossos. Sem o amor de vocês tudo seria mais difícil. Vocês sempre iluminaram o meu caminho, permitindo que eu trilhasse confiante toda essa caminhada.*

*Aos meus preciosos irmãos João, Fabíola, Giselle e Alexandre, por todos os momentos que passamos juntos, muitas brincadeiras, risadas e “comédias”. A minha vida não teria sentido sem vocês.*

*Aos meus sobrinhos fofos, Hugo, Gabriel e Luíza, pela alegria contagiante. Vocês transformam as nossas vidas em doces contos de fadas!*

*As minhas sempre amadas avós, Bé e Irene (in memoriam), por todo amor e doação pela família.*

*Ao meu amado esposo DANYEL, fonte inesgotável de inspiração, admiração e amor. É surpreendente toda sua dedicação com a pesquisa, pacientes e alunos. És exemplo de Profissional e de pessoa humana. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado fazendo-me a mulher mais feliz desse mundo! “...seus olhos meu clarão, me guiam dentro da escuridão, seus pés me abrem o caminho..eu sigo e nunca me sinto só...”*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Minha querida Orientadora e amiga Professora Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA, por toda sua dedicação, caráter e imensa capacidade em me guiar pelo caminho da pesquisa e da “sala de aula”. É nesse imenso coração que tu acolhes todos os teus alunos. Foi muito bom ser recebida, todos os dias, com um sorriso tão doce. Muito obrigada por todas as oportunidades e confiança em mim depositada. És o meu espelho profissional. Minha eterna admiração.*

*Nosso exemplo de liderança, Professor Dr. FRAB NORBERTO BÓSCOLO, por todo o seu amor à Radiologia. Não tenho como agradecer todo o carinho, todos os conselhos, e principalmente toda sua garra, nunca medindo esforços para conseguir tudo que precisei para a realização das pesquisas. És admirável.*

*Professor Dr. FRANCISCO HAITER NETO, por toda sabedoria, experiência e ensinamentos transmitidos. És um exemplo de Radiologista e de Professor.*

*Professor Dr. PEDRO DUARTE NOVAES, a sua dedicação e o seu trabalho são dignos de reconhecimento. Sua experiência e atenção a mim dispensados foram essenciais para o meu aprendizado. Muito obrigada por me ensinar a ser uma Pesquisadora.*

*Professor Dr. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE, pela sua preciosa contribuição neste trabalho. Muito Obrigada por me ensinar conhecimentos tão valiosos e permitir que eu trilhasse por esse fascinante caminho da Histologia.*

*À minha segunda família, os PEREZ, por todo o amor e momentos maravilhosos que passamos juntos. Vocês sabem do orgulho que sinto em pertencer a essa família tão linda.*

## AGRADECIMENTOS

*À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do ilustríssimo Diretor Prof. Dr. Francisco Haíter Neto.*

*A todos os funcionários da FOP-UNICAMP, especialmente à secretaria de Pós-Graduação e os funcionários da limpeza.*

*À disciplina de Bioquímica, em especial, Prof. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, pela ajuda e disponibilidade.*

*À Professora Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, tão atarefada e sempre tão disponível. Muito obrigada por todas as análises estatísticas realizadas neste e em outros trabalhos.*

*Ao querido Professor Dr. Mário Roberto Vizioli por toda experiência e disponibilidade em me ajudar.*

*Aos amigos e Professores da Histologia, em especial, Cidinha e Eliene pela disponibilidade constante e amabilidade com que sempre me trataram. Vocês são amigas especiais.*

*Aos meus grandes e eternos amigos de Recife, em especial: Fabíola, Sofia, Rafaela, Juliana, Cledson, Andréa Miranda, Girleide e Raquel. Amigos são irmãos que escolhemos.*

*Ao Centro de Diagnóstico Boris Berenstein, Recife-PE, onde pude dar os meus primeiros passos como Radiologista. Em especial, meu grande amigo Marco Frazão pela amizade e ensinamentos transmitidos. Não tenho como agradecer por todas as oportunidades. Muito obrigada por acreditar em mim.*

*As minhas “irmãzinhas” de coração Ellen e Maria, pela união, lealdade e grande amizade que nos une. Não há como esquecer as risadas, a nossa culinária impecável e o apoio constante. É muito bom saber que posso contar com vocês.*

*Aos meus “braços direito e esquerdo” Déa Pontual e Dani Pita. Foram muitas as alegrias, risadas e sonhos compartilhados. Não tenho palavras para agradecer toda amizade e companheirismo.*

*À minha grande amiga Juliana Bittar-Cortez por toda amizade, apoio e maravilhosa convivência. A distância não enfraquece a nossa amizade.*

*Às minhas queridas amigas da FOP, Débora Leite, Alynne, Deborah Queiroz, Janaina, Maria Luíza, Déa Domingos, Karina Devito, Márcia Casanova, Adriana Dibo e Simone pela amizade e momentos de descontração ao longo desses seis anos em Piracicaba.*

*À Alexandre Ribeiro do Espírito Santo, pelos conhecimentos transmitidos e preciosa dedicação. Sua ajuda foi imprescindível para realização deste trabalho. Muito obrigada amigo.*

*Aos meus colegas da Pós-Graduação da Radiologia: Matheus, Dani Brait, Carol, Luciana, Ésio, Leticia, Dani Frota, Andréa Kuroiva, Fábio Guedes, Sérgio, Sandro, Rafael e Luis.*

*Aos funcionários e amigos da Radiologia, Roberta, Waldeck, Fernando e Giselda. Muito obrigada por estarem sempre disponíveis a ajudar.*

*Ao Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba, em especial, às técnicas da Radioterapia, Eliete e Maira, pela disposição e paciência para irradiar os animais dessa pesquisa. Obrigada por me receberem sempre com um sorriso no rosto.*

Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira, mas já tantos sonhos se realizaram, que não temos o direito de duvidar de nenhum.

MONTEIRO LOBATO

## RESUMO

O objetivo nesse trabalho foi avaliar a taxa de erupção dentária, a birrefringência da matriz orgânica do esmalte, a morfologia dos tecidos odontogênicos e a ultraestrutura do ameloblasto secretor em incisivos de ratos submetidos à altas doses de radiação X. Para isso foram utilizados, no total, sessenta ratos machos, sendo os primeiros trinta divididos em três grupos experimentais: Controle, Irradiado 15Gy e Irradiado 25Gy, grupos nos quais os animais receberam doses únicas de 15Gy e 25Gy de radiação X, respectivamente, localizada na região de cabeça e pescoço. A mensuração da taxa de erupção dentária foi realizada a cada dois dias, perfazendo o tempo total do experimento (seis dias e meio). Com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento dentário por um período maior, utilizou-se mais trinta animais que foram submetidos ao mesmo tipo de tratamento e, portanto, divididos nos três grupos supracitados. Os valores da taxa de erupção foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Todos os animais sacrificados aos seis dias e meio foram perfundidos, as hemimaxilas removidas, adequadamente fixadas e processadas de acordo com o protocolo de histologia da FOP-UNICAMP. Para birrefringência, mediu-se o valor do retardo óptico da área de maior brilho utilizando microscópio de polarização. Os dados foram encaminhados à análise estatística de variância e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para avaliação da morfologia dos tecidos odontogênicos e ultraestrutura celular foi realizada análise descritiva. Foi possível observar, nos grupos irradiados, uma redução significativa da taxa de erupção a partir do quarto dia. Uma diminuição no brilho de birrefringência foi encontrada nos grupos irradiados em relação ao controle, porém esta só foi significativa para o grupo Irradiado 25Gy. A avaliação dos tecidos odontogênicos revelou, no grupo controle, região odontogênica com aspecto de normalidade e camada de odontoblastos e ameloblastos preservados. Nos grupos irradiados foi possível constatar desorganização das células da região odontogênica, camada de pré ameloblastos com redução na sua altura e odontoblastos muitas vezes ausentes ou pobremente organizados. A análise ultraestrutural revelou em todos os grupos, a presença de organelas íntegras, assim como processo de Tomes bem preservados. Evidenciou-se também a presença de filamentos em contato com as organelas citoplasmáticas. Entretanto, nos grupos irradiados, foram visualizadas diversas áreas de degeneração e a presença dos autofagossomas, sugerindo um processo de morte celular. Baseados nesses resultados, pôde-se concluir que altas doses de radiação X foram capazes de retardar a erupção dentária a partir do quarto dia; reduzir a birrefringência da matriz orgânica do esmalte na fase de secreção da amelogênese; alterar significativamente a morfologia dos tecidos odontogênicos e causar agressão, modificando a ultraestrutura celular.

Palavras-chave: radiação ionizante; ameloblastos; ultraestrutura; birrefringência

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the dental eruption rate, the organic enamel matrix birefringence, the odontogenic tissue morphology and the ultrastructure of secretory ameloblasts in incisor of rats submitted to high radiation doses. For this purpose, sixty male rats were used, the first thirty divided into three experimental groups: Control, 15Gy and 25Gy irradiated groups, which received single doses of 15 and 25Gy of X-rays, respectively, localized in the head and neck region. The measurement of the eruption rate was performed every two days, until the total experimental time was reached (six days and half). As an attempt of analyzing the dental development for a longer period, thirty other animals were used, divided into the same three experimental groups and submitted to the same procedure described above. The eruption rate values were submitted to ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ). All the animals tested in the sixth day and half were perfused, their hemimaxilla removed, adequately fixed and processed according to the histological protocol of FOP-UNICAMP. For birefringence analysis, the optical retardation was measured in the highest birefringence brightness area, using a polarizing microscope. Data were submitted to statistical analysis (ANOVA) and Tukey test ( $p < 0.05$ ). A descriptive analysis was performed for morphologic and ultrastructural evaluation. It was possible to observe, in irradiated groups, a significant reduction in the eruption rate from the fourth day. A reduction in the birefringence brightness was encountered in the irradiated groups in relation to control; this difference was, however, only significant to 25Gy irradiated group. The odontogenic tissue morphology analysis showed, in control group, odontogenic region with normal features and preserved layer of odontoblasts and ameloblasts. Both irradiated groups presented odontogenic cells disorganization, pre-ameloblasts layer reduced in height and odontoblasts absent or poorly organized. The ultrastructural evaluation showed, in all the examined groups, the presence of organelles and Tomes process preserved. The presence of filaments in contact with the cytoplasmatic organelles was also found. However, in the irradiated groups several degeneration areas and autophagosomes were observed, suggesting a cell death process. Based on these results, it was possible to conclude that high radiation doses were capable to delay the eruption rate from the fourth day; to reduce the birefringence brightness of the organic matrix in the secretory stage of amelogenesis; to alter significantly the odontogenic tissues morphology and to cause aggression, modifying the cellular ultrastructure.

Key-words: radiation, ionizing; ameloblasts; ultrastructure; birefringence

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
3. PROPOSIÇÃO	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO	62

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dentário é um processo bastante complexo e o único que leva aproximadamente dezesseis anos para ser completado. Dessa forma, durante todo esse tempo, os dentes estão susceptíveis a distúrbios ambientais que afetam o seu desenvolvimento normal. 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. A mineralização começa nos incisivos centrais durante a décima quarta semana de gestação e continua nos demais dentes até o fechamento apical completo das raízes dos caninos e segundos molares que ocorre por volta dos 14-15 anos de idade (Ten Cate, 2001; Hölfta *et al.*, 2002).

A formação do esmalte começa na fase inicial do estágio de desenvolvimento da coroa dentária e envolve a diferenciação das células do epitélio dentário interno em ameloblastos. As células do epitélio dentário interno induzem as células da papila dentária adjacente a se diferenciarem em odontoblastos para formação da dentina e estas induzem a diferenciação posterior das células do epitélio interno em ameloblastos. A partir daí, os ameloblastos iniciam a síntese e secreção da matriz orgânica de esmalte (Ten Cate, 2001). A matriz orgânica é sintetizada dentro do retículo endoplasmático rugoso, migra para o complexo de Golgi, onde é condensada nas vesículas membranosas. Estas vesículas migram para extremidade apical da célula e todo o seu conteúdo é exportado e depositado ao longo da junção do esmalte e da dentina. Dessa forma há o estabelecimento da junção amelodentinária (Ten Cate, 2001).

Cerca de 50% da população brasileira tem idade inferior a vinte anos. Neoplasias malignas em crianças são raras, representando entre 0,5 e 3,0% de todos os tumores. No Brasil, os Registros de Câncer de Base Populacional indicam que os tumores pediátricos representam cerca de 3,0% de todas as neoplasias malignas ocorridas no país. Em 2008, estima-se que no Brasil ocorrerão 351.720 novos casos de câncer (exceto neoplasias malignas de pele

não-melanoma) e desses, 9.820 novos casos ocorrerão em crianças e adolescentes até os 18 anos de idade (Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil, Instituto Nacional do Câncer). Nos Estados Unidos, a prevalência anual de câncer em crianças de 0 a 14 anos entre 1975 e 1995 foi de 14.540 casos, destes 860 afetando a região de cabeça e pescoço (Linnet *et al.*, 1999). A *American Cancer Society* estima aproximadamente 35.310 novos casos de câncer envolvendo a cavidade oral e orofaringe que serão diagnosticados nos Estados Unidos no ano de 2008 (American Cancer Society, 2008).

Entre as neoplasias malignas da infância, a leucemia é a mais comum, perfazendo um terço de todos os casos nessa faixa etária (Gatta *et al.*, 2002; American Cancer Society, 2008). Entre as leucemias em crianças e adolescentes, a leucemia linfóide aguda é a mais comum, exceto no Japão, China e Zimbábue, onde a leucemia linfóide aguda é menos freqüente que a leucemia mielóide aguda. Os tumores de sistema nervoso ocorrem principalmente em crianças menores de 15 anos e representam cerca de 20% dos tumores infantis. Os tumores ósseos, sobretudo o osteossarcoma, têm sua maior ocorrência em ossos longos de pacientes durante a segunda década de vida. Outra lesão, própria de pacientes pediátricos, é o retinoblastoma, que representa cerca de 2% dos tumores infantis (Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil, Instituto Nacional do Câncer).

Na região de cabeça e pescoço, os linfomas e o rabdomiossarcoma estão entre os tumores malignos mais freqüentes em crianças e adolescentes.

O tratamento para os tumores sólidos é responsável por uma incidência significativamente aumentada de anomalias dentárias quando comparada com as neoplasias linfoproliferativas. Com o aumento da expectativa de vida desses pacientes, faz-se necessário um conhecimento aprofundado dos efeitos agudos e tardios da radioterapia nos tecidos dentários na tentativa de preveni-los ou minimizá-los (Lopes *et al.*, 2006).

A radioterapia para tratamento de tumores malignos da região de cabeça e pescoço é amplamente utilizada e aceita como uma modalidade eficaz de

tratamento. Pode ser utilizada isolada ou em associação à cirurgia e quimioterapia. Embora, recentemente, tenha sido introduzida uma nova modalidade de radioterapia (Intensity modulated radiation therapy - IMRT), resultando em menor volume de tecido irradiado, na maioria dos aparelhos a radiação não é direcionada somente para as células tumorais, afetando também em graus variáveis as células normais incluídas no campo de tratamento (Urbano e Nutting, 2004). Várias são as alterações que podem se desenvolver no complexo maxilomandibular, incluindo xerostomia, osteorradionecrose, mucosite, distúrbios de crescimento associados às injúrias na cartilagem, nos centros de crescimento condilar e distúrbios no crescimento e desenvolvimento dos dentes. (Sweeney *et al.*, 1977; Niehoff *et al.*, 2008).

Os efeitos da radiação nos dentes humanos permanentes erupcionados são bem documentados. O grau de severidade das lesões dentais vai depender do estágio da odontogênese que o mesmo se encontra na época do tratamento, além da dose e área irradiada (Lopes *et al.*, 2006). Poucos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos da radiação nos dentes em desenvolvimento.

As alterações dentárias e maxilofaciais devem ser reconhecidas como uma grave seqüela da irradiação terapêutica dos maxilares. O atendimento do paciente deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar a fim de que estas alterações sejam minimizadas ou eliminadas.

Em ratos, os incisivos crescem continuamente devido à chamada zona progenitora, a qual consiste de um grande número de células mesenquimais indiferenciadas que migram da região apical à margem gengival a uma velocidade uniforme. Estas células têm alta taxa metabólica e estão sempre se diferenciando. O movimento dessas células é importante, pois permite uma correlação com a seqüência de alterações que ocorrem durante a erupção dentária. A zona progenitora de incisivos de ratos é um órgão adequado para se investigar o efeito da radiação X no crescimento celular, visto que as alterações celulares são dose-dependente e quantitativamente reprodutíveis (Lindvall *et al.*, 1972).

Devido à escassez de experimentos sobre as alterações radio-induzidas durante a fase de secreção do esmalte, é pertinente a realização de estudos para avaliação dos efeitos deletérios da radiação na formação da matriz orgânica do esmalte durante a odontogênese.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Esmalte e Matriz Orgânica**

O tecido epitelial que recobre a porção apical dos dentes estende-se por toda a superfície labial, fusionando-se no terço incisal com a gengiva. Este tecido epitelial contínuo é subdividido em órgão odontogênico e órgão do esmalte. Warshawsky e Smith, 1974, dividiram o órgão odontogênico e o órgão do esmalte em zonas de amelogênese. Estas compreendem três regiões principais: região pré-secretória, que inclui os ameloblastos relacionados à polpa (órgão odontogênico) e os ameloblastos relacionados à dentina (órgão do esmalte), sendo a região onde ocorre a deposição e início de mineralização da dentina pelos odontoblastos; região de secreção (órgão do esmalte), representada pelo epitélio interno e epitélio externo, local onde o esmalte é sintetizado; e a região de maturação, a qual se subdivide em região de pós-secreção transitória, região de maturação propriamente dita, região de pigmentação e região de ameloblastos reduzidos.

Smith e Warshawsky, 1976, estudaram o movimento das populações celulares do órgão do esmalte à medida que o dente erupciona, da região odontogênica até a margem incisal, passando pelas várias regiões da amelogênese. Para isso, sete ratos machos jovens (100-300g) receberam dose única de  $1\mu\text{C/gm}$  de  $^3\text{H}$  timidina. Os animais foram sacrificados por perfusão 1 hora, 2, 4, 8, 16 e 32 dias após a injeção do marcador. Foi possível observar que 1 hora após a injeção, os ameloblastos e odontoblastos encontravam-se próximos à região de secreção de pré-dentina; dois dias após, os ameloblastos estavam bem diferenciados e a maioria já se encontrava secretando matriz de esmalte, sendo que esta secreção também foi observada aos quatro dias; aos oito dias, os ameloblastos já se encontravam em fase de maturação. Estes autores afirmaram ainda que os eventos morfológicos vistos durante o desenvolvimento dentário nos incisivos de ratos são análogos aos que são observados nos dentes humanos: a

porção do incisivo coberta por esmalte é considerada a coroa anatômica e a parte recoberta pelo cimento é análoga à raiz.

Durante a renovação do órgão do esmalte nos incisivos de ratos, as células epiteliais são transportadas seqüencialmente através das zonas de pré-secreção, secreção e maturação até a margem gengival, onde o ciclo de vida dessas células termina. Baseado nisto, Smith e Warshawsky, 1977 avaliaram o fluxo destas células dentro de cada uma das regiões da amelogênese, por meio da radioautografia pela injeção intraperitoneal de <sup>3</sup>H-timidina. Pôde-se observar que houve uma diminuição progressiva no número de células à medida que estas atravessavam os compartimentos de formação do esmalte dental. No incisivo superior, o tempo de transição dos ameloblastos na fase de secreção correspondeu a 156 horas. Os achados desse estudo revelaram uma enorme perda no número de ameloblastos, 50%, no curso do estágio da maturação. Os autores acreditam que a principal causa para a diminuição da população dos ameloblastos seja a morte celular e degeneração *in situ*.

Risnes, 1979, calculou a taxa de migração dos ameloblastos durante a fase de secreção baseado nos parâmetros de comprimento e angulação dos prismas de esmalte, comprimento da zona de secreção, taxa de erupção de incisivos impedidos e diâmetro dos incisivos. Os autores afirmam que o tamanho das zonas de secreção de esmalte não varia de acordo com a idade do animal e que o movimento dos ameloblastos é diferente durante a secreção do esmalte interno e externo, dessa forma a velocidade dos ameloblastos durante a secreção do esmalte externo é maior. Ainda de acordo com os autores, em ratos adultos, o tempo decorrido do início ao fim da secreção de esmalte é de 11,4 dias.

De acordo com Smith e Nanci, 1995, a amelogênese é um processo bastante complexo, controlado pelo órgão do esmalte, que culmina com a formação de um tecido altamente mineralizado que recobre a coroa dos dentes. Os ameloblastos começam seu ciclo de vida como uma camada de células colunares baixa e possuem um complexo de Golgi rudimentar localizado no pólo do núcleo. Com a sua diferenciação, sofrem alterações consideráveis em seu

volume, tornando-se células colunares altas. Esta modificação envolve um aumento do volume citoplasmático dedicado ao retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os ameloblastos então invertem sua polaridade, e o complexo de Golgi passa a se movimentar ao redor do núcleo. Inicia-se a secreção das proteínas do esmalte as quais são depositadas apicalmente. Assim que a primeira camada de esmalte é formada, os ameloblastos desenvolvem extensões citoplasmáticas, a partir da superfície apical, chamada de porção distal do processo de Tomes. Quando a espessura do esmalte é atingida, cessa-se a secreção, os ameloblastos diminuem de tamanho e o processo de Tomes desaparece.

Segundo Fincham *et al.*, 1994, 1995 e 1999, o esmalte é a principal estrutura mineralizada dos organismos vertebrados, sendo formado dentro de uma matriz única, extracelular que é derivada da síntese e secreção de proteínas pelos ameloblastos. É composta por 50-60% de água, 20-30% de proteína e 15-20% de mineral. As amelogeninas são as principais proteínas que constituem a matriz orgânica extracelular, elas formam espontaneamente agregados globulares supramoleculares, denominados nanosferas. Estas nanosferas possuem um diâmetro de 18-20nm e foi estimado que sejam compostas de aproximadamente 100 monômeros de amelogeninas. Dentre os outros componentes também foram encontradas as proteínas sulfatadas, as quais apresentam curto tempo de vida e são rapidamente degradadas após sua secreção; albumina sérica, encontrada entre os estágios de secreção e transição, não sendo sintetizada pelos ameloblastos; lipídios; além das proteinases, que são responsáveis pela quebra das proteínas do esmalte e essenciais para completa degradação da matriz, permitindo um rápido crescimento dos cristais durante o estágio de maturação. Os autores sugerem que estes agregados de nanosferas representam um fator essencial para formação da matriz de esmalte, pela sua organização em estruturas altamente ordenadas e bem arranjadas, as quais vão guiar o início do crescimento dos cristais na formação do esmalte.

Moradian-Oldak, 2001, definiu os principais eventos extracelulares que envolvem a formação do esmalte: delimitação do espaço pelos ameloblastos secretores e junção dentino-esmalte; secreção de proteínas, principalmente amelogeninas, pelos ameloblastos do epitélio interno do órgão do esmalte; organização das proteínas amelogeninas formando uma estrutura supramolecular altamente ordenada; transporte de íons cálcio e fosfato pelos ameloblastos; e nucleação, alongamento e crescimento dos cristais de apatita. Posteriormente, no estágio de maturação, ocorre um rápido crescimento e espessamento destes cristais, com a concomitante degradação progressiva e remoção dos componentes da matriz orgânica extracelular do esmalte, principalmente amelogeninas. O autor afirma ainda que as proteínas de amelogenina constituem o principal componente estrutural para o desenvolvimento da matriz extracelular do esmalte dentário.

Espírito Santo e Line, 2005, relatam que as proteínas que compõem a matriz de esmalte são agrupadas em três classes: as amelogeninas (proteínas hidrofóbicas), que correspondem a mais de 90% das proteínas da matriz; a classe das enamelinas e tufelinas (proteínas ácidas), as quais representam cerca de 2%; e a ameloblastina, que perfaz um total de 5% do total de proteínas do esmalte. Estas proteínas formam um tecido bastante organizado e estruturado, o qual é muito importante para a fase de crescimento, morfologia e orientação dos cristais de hidroxiapatita.

Veis, 2005, estudando o processo de biomineralização dos organismos vivos, explica que a deposição mineral no esmalte é um processo bastante diferente. Os ameloblastos alongam-se em direção a junção amelodentinária e cada célula ameloblástica desenvolve uma estrutura assimétrica, os processos de Tomes, que não se comunicam uns com os outros. O espaço localizado entre eles é preenchido por uma matriz rica em amelogenina. Nesta matriz, cristais orientados semelhante à fitas de conteúdo mineral se alongam a partir da junção amelodentinária até a superfície externa do esmalte. As fitas engrossam e se agregam para formar os prismas de esmalte, enquanto que a matriz de amelogenina é degradada e removida.

Moradian-Oldak e Goldberg, 2005, afirmam, a partir de numerosos experimentos *in vitro*, a função da amelogenina como importante indicador do controle da fase mineral, incluindo a forma, orientação e organização dos cristais de hidroxiapatita durante a biomineralização do esmalte. Os autores salientam ainda que os ameloblastos, além de sintetizarem e secretarem as amelogeninas e demais constituintes da matriz, são responsáveis pelo transporte iônico e eventual reabsorção da matriz protéica. A matriz orgânica tem sua degradação iniciada na fase de transição e é extensamente degradada e substituída por componente mineral na fase de maturação.

É escasso o número de trabalhos que reportam a birrefringência da matriz orgânica do esmalte. Em 2006, Espírito Santo *et al.*, se propuseram a estudar a birrefringência da matriz orgânica do esmalte durante o desenvolvimento dos incisivos e molares de ratos utilizando microscopia de polarização. Os animais foram perfundidos com paraformaldeído 2% e glutaraldeído 5%. O incisivo superior e as hemimandíbulas foram removidos, fixados e descalcificados com mistura de formoldeído 4% e ácido nítrico 5% ou em EDTA 5%. Medidas do retardo óptico foram realizadas no estágio precoce de secreção do esmalte, estágio tardio de secreção e no esmalte maduro. Foi possível observar que a matriz do esmalte apresenta uma birrefringência intrínseca negativa em relação ao eixo dos prismas de esmalte e que a máxima birrefringência ocorre quando os prismas estão alinhados em 45° em relação ao polarizador e analisador. Os autores também relataram que o brilho da birrefringência começa a se tornar evidente no estágio precoce de secreção, sendo o maior valor observado na fase final de secreção da matriz do esmalte. No início do estágio da maturação, esta birrefringência diminui, e nesta área a matriz orgânica do esmalte exibe um padrão granular. Nos molares, foi observada forte birrefringência nas áreas de secreção do esmalte, quatro dias após o nascimento. Os autores ainda afirmaram que a análise da matriz orgânica de esmalte pode ser usada para identificar os efeitos genéticos e ambientais na organização supramolecular, correlacionando com efeitos na estrutura do esmalte maduro. Ainda de acordo com os autores acima,

os poucos trabalhos relacionados à birrefringência da matriz orgânica de esmalte utilizando microscopia de polarização deve-se ao fato da dificuldade para padronização da técnica, ou seja, na obtenção, fixação e desmineralização das amostras.

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

## **2.2 Ultraestrutura do ameloblasto**

Slavkin *et al.*, 1976, descreveram as características ultraestruturais do ameloblasto secretor nos incisivos de ratos recém nascidos. Foi possível observar que a maioria das mitocôndrias estava localizada na zona infranuclear, enquanto que acima e lateralmente ao núcleo encontravam-se os complexos de Golgi que apresentavam forma alongada e tubular e próximo a estes, numerosos retículos endoplasmáticos rugosos. Numerosos sáculos de Golgi, os quais dão origem aos vacúolos condensantes, estavam localizados na região lateral acima do núcleo. Na região mais apical do ameloblasto havia numerosos grânulos de secreção, vacúolos condensantes, vesículas de secreção e corpos densos associados aos processos de Tomes. Os produtos de secreção de proteínas do esmalte pareciam estar secretados das regiões lateral e apical dos processos de Tomes, como um material granular pontilhado, precedendo a formação da matriz de esmalte.

Matthiessen e Romert, 1980, descreveram as características ultraestruturais dos ameloblastos secretores encontrados em dentes humanos no estágio de sino. Os ameloblastos secretores formavam uma camada de 45-50µm em altura de células prismáticas, com proeminências basais distintas e processos de Tomes.

As células estavam conectadas umas às outras e ao estrato intermediário por meio dos desmossomos. Os núcleos eram ovóides e longitudinalmente orientados. No citoplasma muitas mitocôndrias foram encontradas, especialmente na porção distal, próximo ao processo de Tomes. Muitas cisternas endoplasmáticas granulares com conteúdo denso foram vistas, tanto espalhadas, quanto formando filas paralelas. A maioria dessas cisternas foi encontrada distalmente à periferia do núcleo e aos complexos de Golgi. Muitas vesículas revestidas e lisas foram vistas em conexão com os complexos de Golgi, algumas delas contendo um material de aspecto granular que formava grânulos secretórios. Pequenos feixes de filamentos e muitos microtúbulos foram observados espalhados no citoplasma e grânulos de glicogênio foram ocasionalmente encontrados. Os aspectos estruturais observados nessa investigação diferem da ultraestrutura celular no rato apenas na localização das mitocôndrias, que neste último se acumulam na região proximal da célula.

Sasaki, 1983, a partir de um estudo realizado em ratos, descreveu a ultraestrutura dos ameloblastos secretores, enfatizando o complexo de Golgi e organelas relacionadas. O complexo de Golgi estava situado na região citoplasmática acima do núcleo, orientado paralelo ao longo eixo da célula, com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso. São compostos basicamente por 4-7 cisternas planas, associadas a pequenas vesículas e vacúolos condensantes. Na região mais interna do aparato de Golgi, foram observados vacúolos condensantes de aproximadamente 150-200nm, que o autor denominou lisossomos retículo endoplasmático-Golgi. O autor sugeriu que múltiplas organelas do ameloblasto secretor participam do processo de secreção do esmalte. O complexo de Golgi e o conjunto lisossomos retículo endoplasmático-Golgi, os quais ocupam a maior parte do citoplasma supranuclear, provavelmente controlam todas as funções secretórias, tais como síntese protéica, transferência de cálcio e formação lisossômica.

McKee e Warshawsky, 1984, também avaliaram quantitativamente o retículo endoplasmático rugoso dos ameloblastos secretores. Os ameloblastos se

apresentavam de forma hexagonal ou pentagonal e dispostos em fileiras. Numerosos arranjos de retículos endoplasmáticos rugosos estavam presentes e quando localizados próximos à membrana celular apresentavam padrão circular. Na região supranuclear dos ameloblastos foi notada a presença de estruturas semelhantes às cisternas de subsuperfície, estas se apresentavam em forma de sáculos planos, e sua principal característica era a ausência de ribossomos na face voltada para a membrana celular. Estas estruturas são bastante desenvolvidas nos ameloblastos em fase de secreção e podem ser responsáveis por alguma forma de comunicação intercelular.

Akita e Kagayama, 1985, avaliaram a ultraestrutura dos ameloblastos de incisivos de ratos após perfusão vascular com colchicina, droga utilizada a fim de se estudar a função celular. Os autores observaram que o grupo controle apresentava retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido na região citoplasmática supranuclear, complexo de Golgi com pequeno número de grânulos de secreção e raras mitocôndrias no longo eixo da célula. Já na região de citoplasma infranuclear, havia numerosas mitocôndrias, estando presentes entre elas, estruturas relativamente curtas de retículo endoplasmático rugoso. Nos grupos tratados, uma hora após perfusão com colchicina, as alterações mais notáveis foram a fragmentação aparente ou fenestração do retículo endoplasmático rugoso e o acúmulo de grânulos de secreção e vesículas no citoplasma supranuclear da célula. Estas freqüentemente possuíam núcleo pequeno e denso. Vacúolos tipo fagossomas também foram encontrados, tanto no citoplasma supra quanto no infranuclear, além da desorganização do complexo de Golgi. Duas horas após o tratamento com colchicina além das alterações supracitadas também foi possível notar grupos de material eletrodense no retículo endoplasmático rugoso, desorganização do complexo de Golgi, os vacúolos tipo fagossomas eram mais freqüentes e presença de substância semelhante à matriz de esmalte no espaço intercelular.

As proteínas de secreção são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e transportadas para as cisternas de Golgi, para serem liberadas.

Baseados nesse processo de secreção protéica da maioria das células eucarióticas, Matsuo *et al.*, 1988, se propuseram a avaliar a trajetória seguida pelas proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso até o complexo de Golgi. Os autores observaram que o desenvolvimento das pequenas vesículas no retículo endoplasmático rugoso ocorre não apenas na região transicional deste sistema, mas também em outras regiões citoplasmáticas do ameloblasto secretor, incluindo a região infranuclear da célula.

Takano *et al.*, 1990, avaliando cortes ultrafinos por meio da microscopia eletrônica de transmissão, observaram que os ameloblastos mais diferenciados apresentavam processo de Tomes alongados, mitocôndrias localizadas principalmente no compartimento celular proximal, enquanto poucas mitocôndrias foram observadas na porção distal da célula. No compartimento distal havia poucas estruturas granulares eletrodensas, sendo estas mais comuns nos ameloblastos na fase inicial da amelogênese. Além disso, figuras eletrodensas finas semelhantes a fitas foram ocasionalmente observadas em algumas estruturas túbulos-vesiculares localizadas nas regiões dos processos de Tomes.

Massa e Arana-Chaves, 2000, estudaram a ultraestrutura do germe dental de ratos utilizando um procedimento no qual a fixação e tempo de processamento foram significativamente reduzidos com o uso da radiação de microondas. Os autores puderam observar uma boa preservação dos constituintes orgânicos; o citoplasma dos ameloblastos em diferenciação mostrava organelas citoplasmáticas típicas, as quais incluíam mitocôndrias, vesículas revestidas e polirribossomas, todos exibindo preservação excelente. Também foram observados numerosos microtúbulos e finos filamentos entre as organelas. Após a completa mineralização da dentina, o primeiro depósito mineral no esmalte apareceu na forma de cristais finos e longos, os quais estavam circundados por uma matriz orgânica de aspecto globular e eletrolucente.

De acordo com Ten Cate, 2001, a ultra-estrutura do ameloblasto secretor reflete a sua função de síntese protéica e secreção. A síntese de proteína ocorre no retículo endoplasmático granular, de onde passa para o complexo de Golgi.

Este conteúdo é condensado e armazenado em grânulos secretores, que migram para a extremidade distal ou apical da célula, liberando o produto de secreção sobre a dentina recém- formada. Assim que essa primeira camada de esmalte é formada, os ameloblastos se afastam, permitindo a formação dos processos de Tomes, estes são alongados e possuem os grânulos de secreção ou vesículas de exocitose.

De acordo com Ribeiro *et al.*, 2006, os ameloblastos secretores são células altas e colunares e em sua porção apical observam-se uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, alguns grânulos de secreção no citoplasma e presença do complexo juncional. A presença dos grânulos de secreção também está concentrada na região dos processos de Tomes. O núcleo encontra-se ocupando grande parte da porção basal. Várias mitocôndrias, de diversas configurações, estão concentradas no citoplasma basal e uma pequena quantidade disposta nas demais regiões.

### **2.3 Efeitos da Radiação ionizante no desenvolvimento dentário**

Koppang e Stokke, 1969, se propuseram a avaliar 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: 7Gy, 6Gy, 5Gy, 4Gy, 3Gy e 2Gy. 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 (2Gy) foi capaz de induzir a formação de lesões completas e incompletas na face vestibular dos incisivos superiores, enquanto que a dose de 7Gy 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.

Lindvall *et al.*, 1972, avaliaram a relativa radiosensibilidade da amelogênese e dentinogênese. Para isto utilizaram 75 ratos aleatoriamente divididos em nove grupos, de acordo com a dose e tempo de sacrifício: grupo 1 (5Gy- 21 dias), grupo 2 (6Gy- 21 dias), grupo 3 (7Gy- 21dias), grupo 4 (9,5Gy- 21dias), grupo 5 (7Gy- 5dias), grupo 6 (7Gy-10 dias), grupo 7 (9,5Gy-10 dias), grupo 8 (9,5Gy-21 dias) e grupo 9 (controle). Os autores puderam observar alterações em dentina e esmalte com doses que variaram de 5 a 9,5Gy e as reações aumentaram em extensão com o aumento da dose. A gravidade e extensão das lesões foram maiores na dentina. As alterações no esmalte foram observadas com doses menores, enquanto que com estas mesmas doses, as alterações na dentina não foram tão freqüentes. Pode-se concluir que a amelogênese é mais radiosensível do que a dentinogênese.

Horn *et al.*, 1975, compararam o efeito de doses únicas e fracionadas de radiação X no incisivo de ratos. Os grupos foram divididos de acordo com a dose administrada, grupo I (dose única de 1.500 R), grupo II (3 doses, totalizando 2.400 R), grupo III ( 5 doses, totalizando 2.690 R) e grupo IV (controle). Radiograficamente pôde-se observar que o incisivo superior foi afetado em todos os períodos experimentais. Nos ratos que receberam doses fracionadas, uma interrupção na odontogênese entre o terço basal e médio foi encontrada, e naqueles que receberam dose única, esta interrupção foi acompanhada por uma posterior renovação e formação dentária modificada. Histologicamente, as áreas de interrupção presentes nos grupos com doses fracionadas mostravam interrupção na aposição de dentina, presença de lacunas de reabsorção, necrose e completo desaparecimento das camadas germinais do dente. No grupo que recebeu dose única, as alterações consistiam na formação de uma barreira calcificada no sítio da interrupção, o tecido odontogênico na área basal parecia recuperado e a diferenciação dos ameloblastos e odontoblastos ocorreu apenas em áreas isoladas, acarretando em aposição de matriz de esmalte e dentina irregulares. Pôde-se concluir que doses fracionadas de raios X são mais prejudiciais que doses únicas.

Sweeney *et al.*, 1977, compararam, por meio de avaliação histológica, os efeitos de doses fracionadas de 24 (grupo II), 48 (grupo III) e 72Gy (grupo IV) de radiação gama na formação e no desenvolvimento dentário em ratos. Os animais pertencentes aos grupos irradiados receberam 6Gy a cada três dias até a dose final dos respectivos grupos ser atingida. Os animais foram sacrificados em tempos pré-determinados para cada grupo, os quais variaram de 7 até 70 dias pós irradiação. Foi possível observar que o grupo II (24Gy) apresentou características morfológicas semelhantes às observadas no grupo controle. Diferentemente, o grupo III (48Gy) apresentou alterações patológicas em todos os tempos de análise, sendo mais severas nas primeiras três semanas após a exposição. Estas alterações afetaram apenas o incisivo, na região de odontogênese, incluindo ruptura do arranjo normal das células odontoblásticas e formação de dentina irregular. No grupo IV (72Gy) foram evidenciadas as mais severas e persistentes alterações, estando os ameloblastos e odontoblastos acentuadamente lesados. Os autores concluíram que danos aos ameloblastos ocorreram em doses mais elevadas e que doses fracionadas, perfazendo um total de 72Gy não apresentaram nenhum efeito nos dentes erupcionados, mas proporcionaram um acentuado efeito nos dentes que estavam em desenvolvimento.

Kahn *et al.*, 1979, estudaram os efeitos da radiação X no desenvolvimento dentário *in vitro* dos germes dos molares de ratos. Para isto ratas grávidas tiveram seus fetos removidos aos 18 dias de gestação, decapitados e o germe do primeiro molar extraído. Os germes dentários foram expostos à 16Gy de radiação X no segundo dia da cultura *in vitro* e acompanhados por 12 dias. Várias alterações foram observadas nos grupos irradiados, as quais dependeram do tempo de sacrifício pós-irradiação, tais como, morfologia anormal das cúspides (24 horas após a irradiação); pré ameloblastos e pré odontoblastos com degeneração moderada (48 horas após a irradiação); ausência de produção de esmalte e falha na calcificação da dentina (6-7 dias após a irradiação); degeneração severa dos ameloblastos e completa dos odontoblastos aos 10 dias pós-irradiação.

Pearson e Phelps, 1981, avaliaram os efeitos da irradiação gama de corpo todo, com doses que variaram de 8 a 16Gy em dentes de ratos. Os autores não observaram morte aguda dos animais, esta só foi ocorrer aproximadamente 20 semanas após a irradiação. Os danos aos dentes foram detectados após sete semanas da irradiação nos grupos que receberam 12, 14 e 16Gy, sendo a ausência dentária o defeito mais observado, 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.

Sonis *et al.*, 1990, avaliaram o desenvolvimento dentofacial em noventa e sete crianças com idade inferior a dez anos, tratadas para leucemia linfoblástica aguda com quimioterapia apenas, quimioterapia associada a 18Gy de irradiação na região craniana e quimioterapia associada a 24Gy de radiação também na região craniana. Foi possível observar agenesia dentária, interrupção do desenvolvimento radicular, microdontia e displasia do esmalte. A severidade das alterações dentárias encontradas foi maior em crianças que receberam tratamento antes dos cinco anos de idade e naqueles que receberam tratamento radioterápico adjuvante. Dessa forma, os autores sugerem que os dentes em fase inicial de formação possuem maior risco de apresentar distúrbios do desenvolvimento do que os dentes completamente formados.

Saad *et al.*, 1991, verificaram os efeitos da radiação gama no desenvolvimento pré-natal de incisivos de ratos. As ratas grávidas foram expostas a 4 Gy de radiação gama no 12º dia de gestação, quando os incisivos dos embriões apresentavam-se na fase de sino. As ratas foram sacrificadas no 18º dia de gestação. Foi constatado atraso no desenvolvimento dos incisivos superiores e inferiores dos animais irradiados, ausência da matriz de dentina, a papila se encontrava pobremente estabelecida, com áreas de necrose e as células do epitélio interno do órgão do esmalte apresentavam-se pobremente diferenciadas, mostrando falha na polarização. No grupo controle, foi verificada aposição da matriz de dentina, os odontoblastos e pré-ameloblastos apresentavam-se em

forma de colunas altas, polarizados e arranjados de maneira oposta entre si, com alto grau de diferenciação. Baseado nestes achados, os autores concluíram que a radiação gama interfere na citodiferenciação do órgão do esmalte e papila dentária, com subsequente inibição da odontogênese normal.

Ubios *et al.*, 1992, avaliaram o crescimento mandibular e a taxa de erupção dentária em molares de ratos jovens (55 dias) submetidos a altas doses de radiação X localizadas na região de molares. Os grupos foram subdivididos em controle e irradiado (20Gy), com tempos de sacrifício de 30 e 60 dias. Foi possível observar que os animais irradiados apresentavam atrofia muscular e micrognatia (redução do comprimento e altura da mandíbula), além de atraso ou falha na erupção dos molares inferiores. A diminuição da taxa de erupção foi estatisticamente significativa para ambos os períodos de avaliação.

Dahlöf *et al.*, 1994, estudaram os efeitos da radioterapia e quimioterapia no desenvolvimento dentário de uma criança portadora de leucemia linfoblástica aguda. No momento do diagnóstico a paciente apresentava dentição decídua. A paciente foi inicialmente tratada de acordo com o protocolo de quimioterapia padrão e dois anos após o diagnóstico recebeu dose de radiação de 10Gy corpo todo e transplante de medula óssea. Foi possível observar a presença de raízes curtas e cônicas, fechamento apical prematuro nos incisivos e primeiros molares permanentes. Nove anos após, todos os dentes exibiam distúrbios de desenvolvimento radicular, coroas dentárias pequenas e hipoplasia do esmalte. A localização da hipoplasia no terço cervical do segundo pré-molar correspondeu à época de irradiação. Os autores puderam concluir que a radioterapia durante a fase de formação dentária induz o aparecimento de alterações quantitativas e qualitativas e que crianças tratadas com transplante de medula óssea antes dos 12 anos de idade e que receberam 10Gy de radiação exibem distúrbios no desenvolvimento dentário e craniofacial.

Kaste *et al.*, 1997, avaliaram as alterações dentárias encontradas em pacientes que se submeteram à terapia para leucemia linfoblástica aguda. Foram estudados os prontuários clínicos e radiografias panorâmicas de 423 pacientes,

onde foi possível observar a presença de raízes mal formadas e atrofiadas (24,4%), microdontia (18,9%), hipodontia (8,5%), taurodontia (5,9%) e retenção dos dentes decíduos (4,0%). Estas alterações foram mais frequentes em pacientes com idade equivalente ou inferior a oito anos e que receberam tratamento radioterápico na região craniana. Todos os pacientes avaliados relataram que tais alterações afetavam a qualidade de vida. Os autores afirmaram que a avaliação dentária no momento do diagnóstico e um acompanhamento rigoroso destes pacientes devem ser realizados, a fim de prevenir ou minimizar tais alterações.

Manzi, 2005, avaliou o efeito da radiação X no desenvolvimento dentário de fetos de ratos, particularmente no desenvolvimento dos primeiros molares. Os fetos foram irradiados com doses de 1 e 4Gy *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 trinta dias após o nascimento e as 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 4Gy, principalmente no estágio de sino (irradiado aos 19 dias), os quais apresentaram fusão das cúspides, fraturas coronárias e canalículos dentinários levemente mais delgados e dispersos. Para dose de 1Gy foram observadas alterações dimensionais apenas nos molares irradiados no estágio de sino (irradiado aos 19 dias).

Lopes *et al.*, 2006, avaliaram por meio de radiografias panorâmicas, a prevalência de alterações dentárias em crianças, com média de idade de cinco anos, portadoras de câncer e tratadas com quimioterapia ou quimioterapia associada a radioterapia na região de cabeça e pescoço. Os pacientes 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 (7%),

macrodontia (5%), anodontia (6%), taurodontia (14%), além das alterações radiculares (6%).

Niehoff *et al.*, 2008, se propuseram a estudar a ação de dose única de 20Gy de radiação X por braquiterapia nos ossos e dentes da mandíbula de ratos. Para isso foi implantado um tubo plástico ao longo da cortical direita vestibular da mandíbula, se exteriorizando abaixo do pavilhão auricular. Logo após a radioterapia, o tubo aplicador foi removido. Os animais foram sacrificados cem dias após o experimento. Foi possível observar de maneira geral que a dose foi bem tolerada pelos animais. Aproximadamente duas semanas após a irradiação foi notada alopecia no lado direito, região que recebeu a irradiação, além da redução no crescimento do incisivo inferior direito. No lado oposto não foram detectadas alterações. As diferenças na estrutura óssea entre os lados direito (irradiado) e esquerdo foram visíveis, mas não significativas, não sendo encontradas diferenças nos valores de densidade óssea entre os grupos irradiado e controle, no entanto a espessura do côndilo mandibular do lado direito (irradiado) estava significativamente reduzida em comparação ao esquerdo. Os animais do grupo irradiado apresentaram menor aposição óssea do lado direito quando comparado com o lado esquerdo, estando este último semelhante ao controle.

### **3. PROPOSIÇÃO**

Utilizando-se ratos submetidos a altas doses de radiação X, os objetivos neste estudo foram:

- Avaliar a taxa de erupção dentária;
- Analisar a birrefringência da matriz orgânica do esmalte;
- Avaliar a morfologia dos tecidos odontogênicos e a ultra-estrutura do ameloblasto.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Seleção dos animais**

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados, no total, 60 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus Wistar), machos, com idade aproximada de 60 dias e peso médio de 250 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. Este trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, sob protocolo de número 1106-1.

### **4.2 Irradiação**

Inicialmente, 30 animais foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais:

- Grupo 1 (G1), cujos animais não receberam qualquer tipo de tratamento e serviram como grupo Controle;
- Grupo 2 (G2), no qual os animais receberam uma dose única de 15 Gy de radiação X na região da cabeça e pescoço;
- Grupo 3 (G3), no qual os animais receberam uma dose única de 25 Gy de radiação X localizada na região de cabeça e pescoço.

Previamente ao procedimento de irradiação, todos os animais foram anestesiados, via intramuscular, com 1,0 ml/kg de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® AgribRANDS do Brasil Ltda., Paulínea, São Paulo, Brasil) e 1,5 ml/kg de Cloridrato de Xylasina (Rompum®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Os animais pertencentes aos grupos irradiados receberam dose única de 15Gy(G2) e 25Gy(G3) de radiação X 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

15x30cm, de modo que apenas a região de cabeça e pescoço fosse irradiada. (Figuras 1a e 1b).



Figura 1a- Ratos devidamente posicionados para o procedimento de irradiação da região de cabeça e pescoço.



Figura 1b- Visão mais detalhada dos ratos posicionados para o procedimento de irradiação da região de cabeça e pescoço.

### **4.3 Avaliação da taxa de erupção dentária**

A taxa de erupção dentária foi medida em todos os animais. Para isto foi realizada uma marca linear na face vestibular do incisivo central superior com o auxílio de uma broca cilíndrica adaptada a uma caneta de alta rotação sob refrigeração (Figura 2). 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+ 100/100mm), foi medida a distância da margem gengival até a marca confeccionada com a broca, sendo este procedimento repetido três vezes (Merzel *et al.*, 2000). As medidas foram realizadas a cada dois dias, perfazendo o tempo total do experimento (6 dias e meio). Com o objetivo de avaliar-se o comportamento eruptivo dos dentes irradiados ao longo do tempo, optou-se em aumentar o período de avaliação para três semanas, dessa forma foram utilizados mais 30 animais, que foram submetidos ao mesmo tipo de tratamento e, portanto, divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: G1; G2 e G3. Esses animais foram sacrificados por prolongamento anestésico ao fim da terceira semana.

Dessa forma, durante o período experimental pode-se quantificar o crescimento dentário dos animais nos diversos grupos de estudo. Os valores foram transformados em milímetros e as médias submetidas à análise estatística de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Figura 2– Marca realizada no incisivo superior dos animais para auxílio na mensuração da taxa de erupção.

#### **4.4 Sacrifício e retirada dos espécimes**

Os demais animais foram sacrificados seis dias e meio após a irradiação, pois de acordo com Smith e Warshawsky, 1976, 1977, neste tempo as células mesenquimais provenientes da região odontogênica já estão diferenciadas em ameloblastos e, portanto, se encontram na fase de secreção da matriz de esmalte. Nesta fase, de acordo com Espírito Santo *et al.*, 2006, é onde se observa a maior birrefringência da matriz orgânica do esmalte.

Para o sacrifício, os animais foram perfundidos com solução de Karnovsky (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,2M, pH 7,2). Os espécimes, constituídos por hemimaxilas, foram removidos e fixados por 48 horas em fixador de Karnovsky.

#### **4.5 Preparo dos espécimes para a análise da birrefringência**

Após a fixação, foi selecionada uma hemimaxila de cada animal para avaliação da birrefringência. As hemimaxilas foram descalcificadas em mistura de formoldeído 4% e ácido nítrico 5%, por um período de 24 horas, sendo as primeiras quatro horas sob agitação. Em seguida foram lavadas em água corrente por 1 hora, desidratadas em banhos crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes seriados longitudinais de 5 µm de espessura foram obtidos, desparafinizados, hidratados e montados com glicerina 80%. Após trinta minutos da montagem dos cortes, os mesmos foram analisados em microscópio Leica DMLP (Leica Microsystems) equipado com filtros polarizadores, compensador de Brace-Köhler (Wild Leitz, Wetzlar, Germany) e luz policromática (Figura 3).



Figura 3- Microscópio Leica DMLP

#### **4.6 Análise da birrefringência da matriz orgânica de esmalte**

A birrefringência é uma propriedade anisotrópica que reflete alto grau de organização em nível molecular, este fenômeno é causado pela diferença entre dois índices de refração de uma substância. Quando a luz polarizada atravessa estruturas birrefringentes, como a matriz orgânica do esmalte secretório, ela se propaga como duas frentes de onda, o desvio relativo entre essas duas frentes é denominado de retardo óptico, é expresso em nanômetros, sendo diretamente proporcional à intensidade do brilho de birrefringência (Espírito Santo *et al.*, 2007).

O retardo óptico (RO) foi medido na área de maior brilho de birrefringência da matriz orgânica do esmalte (MOE) no estágio de secreção da amelogenese, em cortes de 5 $\mu$ m de espessura de incisivo superior de todos os animais. Para montagem das lâminas, utilizou-se solução aquosa de glicerina 80% (Espírito Santo *et al.*, 2006). As mensurações de RO foram realizadas cinco vezes em quinze cortes de hemimaxila de cada animal. As médias dos valores obtidos foram submetidas à análise estatística de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Todos os cortes utilizados para avaliação da birrefringência foram posteriormente corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e analisados com microscopia de luz comum para avaliação morfológica dos tecidos odontogênicos.

#### **4.7 Avaliação morfológica por Hematoxilina e Eosina (HE)**

Para avaliação morfológica, dez lâminas de cada grupo foram aleatoriamente selecionadas para avaliação descritiva dos tecidos odontogênicos. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, montadas com bálsamo do Canadá e analisadas em microscópio de luz comum.

#### **4.8 Avaliação ultraestrutural dos ameloblastos**

Após os tempos de sacrifício pré-estabelecidos e adequada fixação dos espécimes da amostra, a outra hemimaxila foi processada para avaliação ultraestrutural. Desta forma, as amostras foram descalcificadas em EDTA 4,13% tamponado em tampão fosfato 0,1M. Após a descalcificação, as peças foram lavadas em tampão fosfato e posteriormente fixadas em tetróxido de ósmio 1%, 0,1M tamponado em tampão fosfato, pH 7,3 em temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratados em soluções crescentes de acetona 50%, 70%, 80% e 90% e finalizadas em acetona pura. Os fragmentos foram embebidos e incluídos em resina Araldite. Cortes semifinos (1-2  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos utilizando um ultramicrotomo MT2B Sorvall Porter Blum com navalhas de vidro. Em seguida foram corados com azul de toluidina, para selecionar a região a ser estudada. Na seleção, a área escolhida compreendeu as regiões que apresentavam porções de ameloblastos secretores. Após a seleção, os blocos foram aparados para obtenção de cortes ultrafinos (70-90nm) em ultramicrotomo MT2C. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

As grades foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM-10, sendo avaliadas as alterações ultraestruturais citoplasmáticas e nucleares dos ameloblastos em todos os grupos estudados.

## 5. RESULTADOS

No dia do sacrifício foi possível observar que os ratos irradiados com dose única de 25Gy apresentavam queimaduras, alopecia e perda de peso (Figura 4) quando comparados aos animais do grupo controle e irradiados com 15Gy de radiação X.



Figura 4- Queimadura e alopecia na região submandibular em animal do grupo 25Gy.

### 5.1 Taxa de Erupção

A avaliação dos resultados da taxa de erupção nos mostra que no tempo de dois dias, apesar da diminuição observada nos grupos 15Gy e 25Gy em relação ao controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Uma diminuição significativa entre os grupos foi encontrada aos quatro e seis dias. Os animais pertencentes ao grupo controle apresentaram valores semelhantes ao longo dos seis dias de experimento, diferentemente dos grupos irradiados 15 e 25Gy, que apresentaram diminuição estatisticamente significativa na taxa de erupção no sexto dia (tabela 1 e figura 5).

Tabela 1 – Média (mm) e desvio padrão dos valores da taxa de erupção nos grupos controle e irradiados obtidas a cada dois dias.

Tempo	Grupos		
	Controle	15Gy	25Gy
2 dias	0.80 (0.08) Aa	0.73 (0.15) Aa	0.66 (0.08)AA
4 dias	0.80 (0.05) Aa	0.63 (0.11) Bab	0.56 (0.16) BA
6 dias	0.89 (0.09) Aa	0.48 (0.08) Ba	0.34 (0.14) BB

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

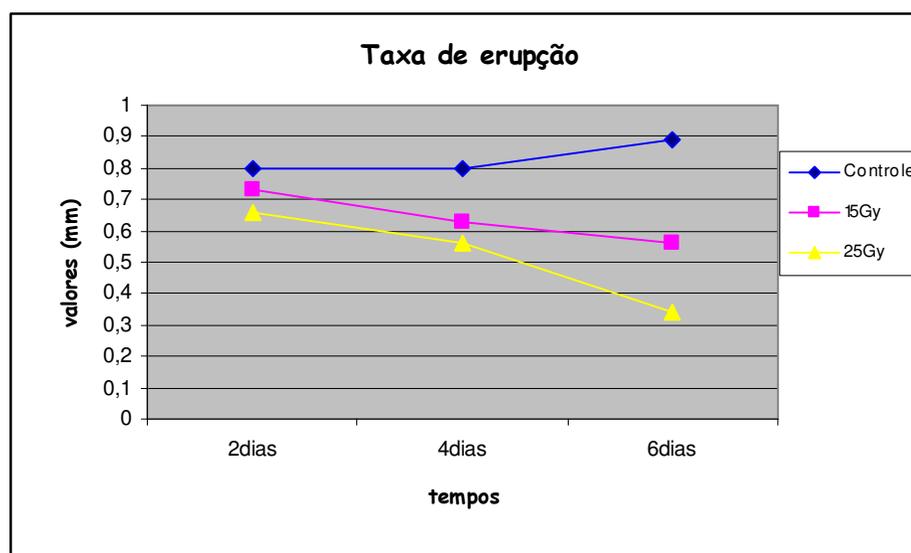


Figura 5- Gráfico ilustrando os valores (mm) da taxa de erupção em função do tempo dos três grupos experimentais durante os seis dias de avaliação.

Foi realizado um acompanhamento do crescimento dentário ao longo de três semanas, nos grupos Controle e 15Gy. A ausência de medidas para o grupo irradiado 25Gy deve-se ao fato de que os animais morreram na segunda semana devido aos efeitos adversos da radiação, tais como queimaduras locais e perda

acentuada de peso. Pôde-se observar que os animais do grupo controle apresentaram valores semelhantes durante as três semanas do experimento, diferentemente do grupo irradiado 15Gy, onde notou-se uma diminuição estatisticamente significativa na taxa de erupção nas segunda e terceira semana de experimento. O grupo irradiado 15Gy apresentou redução significativa na medida da taxa de erupção nos três períodos avaliados quando comparado ao grupo controle (tabela 2 e figura 6).

Tabela 2 – Média (mm) e desvio padrão dos valores da taxa de erupção nos grupos controle e irradiado 15Gy obtidos após 1, 2 e 3 semanas de experimento.

<b>Tempo</b>	<b>Grupos</b>	
	Controle	15Gy
1 semana	2.98 (0.24) Aa	2.40 (0.21) Ba
2 semana	3.01 (0.29) Aa	1.68 (0.14) Bb
3 semana	2.92 (0.27) Aa	1.76 (0.26) Bb

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

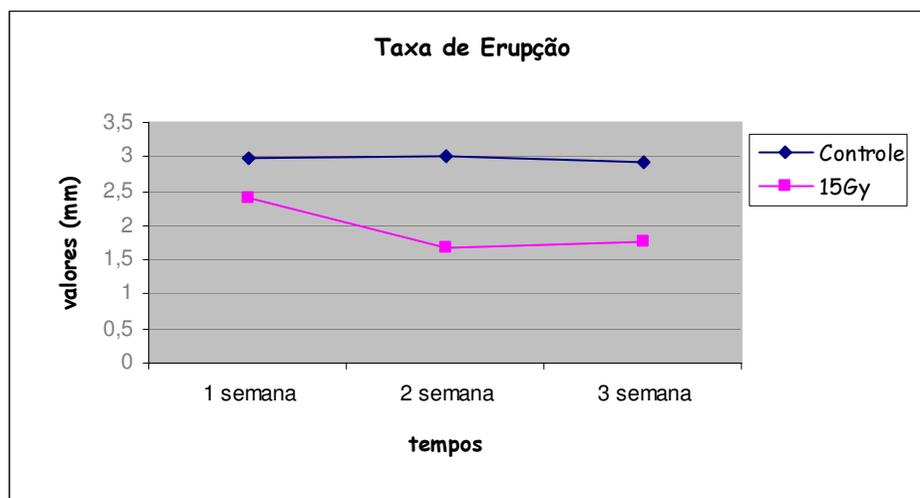


Figura 6: Gráfico ilustrando os valores (mm) da taxa de erupção em função do tempo nos grupos controle e irradiado 15Gy durante as três semanas de avaliação.

## 5.2 Birrefringência da matriz de esmalte

Pela análise dos resultados, foi possível observar diminuição nos valores de retardo óptico para os grupos 15Gy e 25Gy em relação ao grupo controle. Porém, essa diferença só foi estatisticamente significativa no grupo irradiado com 25Gy, quando comparado ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3- Média (desvio padrão) dos valores de retardo óptico (nm) de cortes de 5µm de espessura dos três grupos de estudo.

Grupos	Retardo óptico (nm) (média ±dp)
Controle	17,21 <sup>a</sup> ± 3,70
15Gy	14,46 <sup>ab</sup> ± 2,12
25Gy	13,26 <sup>b</sup> ± 2,39

Letras distintas expressam diferença estatisticamente significativa pela ANOVA e teste de Tukey (p= 0,03).

Figura 7 ilustra os cortes histológicos não corados (à esquerda) e corados com hematoxilina e eosina (à direita) que representam o brilho da birrefringência e a morfologia tecidual correspondente, respectivamente, dos diversos grupos do estudo.

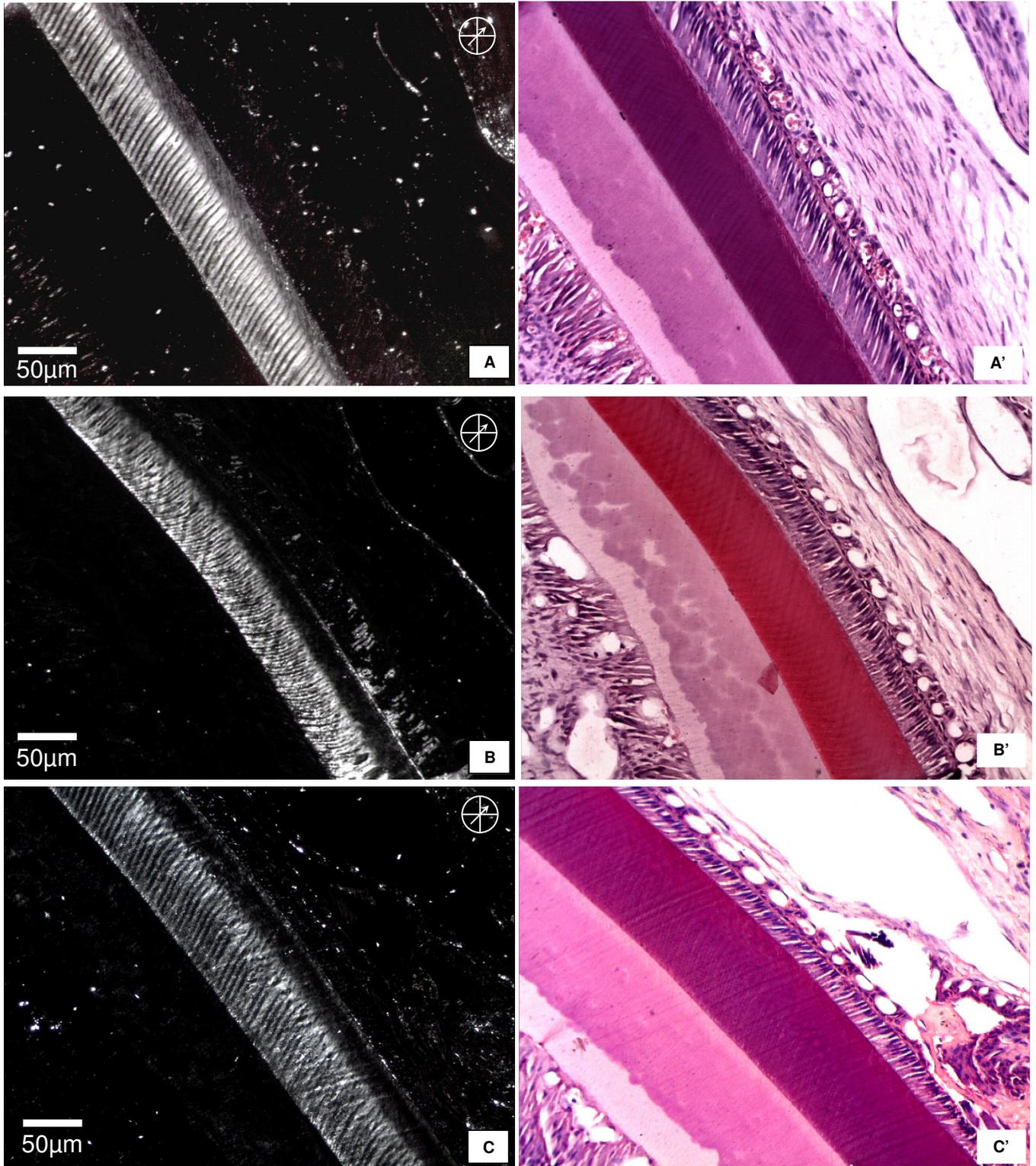


Figura 7- Cortes microscópicos (5µm) longitudinais de incisivo superior de ratos em luz polarizada não corados (à esquerda) e luz comum corados em HE (à direita), dos grupos controle, irradiado 15Gy e irradiado 25Gy. O círculo com barras cruzadas em seu interior representa o analisador e polarizador. A seta em 45° com o analisador e polarizador indica a posição de máxima birrefringência. (A): forte brilho de birrefringência da matriz orgânica do esmalte no grupo Controle; (A'): corte representativo de A corado em HE (x200); (B): diminuição no brilho de birrefringência da matriz orgânica do esmalte no grupo Irradiado 15Gy; (B'): corte representativo de B corado em HE (x200); (C): birrefringência diminuída da matriz orgânica do esmalte no grupo Irradiado 25Gy; (C'): Corte representativo de C corado em HE (x200).

### **5.3 Avaliação histológica**

No grupo controle, a análise microscópica dos cortes histológicos corados em HE dos incisivos de ratos, revelou região odontogênica com tecido conjuntivo mixóide bem celularizado, ausência de reação inflamatória, necrose ou quaisquer outras alterações patológicas. Além disso, vasos sanguíneos com diferentes diâmetros também foram observados. Na periferia do tecido pulpar, adjacente a dentina que se apresentava com características normais, foi observada camada de odontoblastos bem organizada, na qual as células estavam dispostas paralelamente umas às outras. A camada de ameloblastos encontrava-se preservada e na região de ameloblastos secretores observava-se fina camada de matriz orgânica de esmalte (Figura 8A, A').

Nos animais irradiados com dose única de 15Gy de radiação X, foi possível constatar na região odontogênica desorganização das células que a compõem, com presença de pequena quantidade de tecido eosinofílico, hialino, homogêneo e amorfo. Na região correspondente aos ameloblastos pré-secretores notou-se desorganização e diminuição da altura destas células. Além disso, não foram observados odontoblastos nesta região (Figura 8B, B').

No grupo irradiado com dose única de 25Gy de radiação X foi possível notar intensificação dos efeitos descritos no grupo 15Gy, com presença de

extensa área com tecido hialino, eosinofílico e amorfo. A camada de pré-ameloblastos na região correspondente à zona pré-secretora de esmalte se apresentava desorganizada, reduzida e com diminuição da altura das células que a compõem. Adicionalmente, observava-se camada de odontoblastos reduzida e desorganizada (Figura 8C, C').

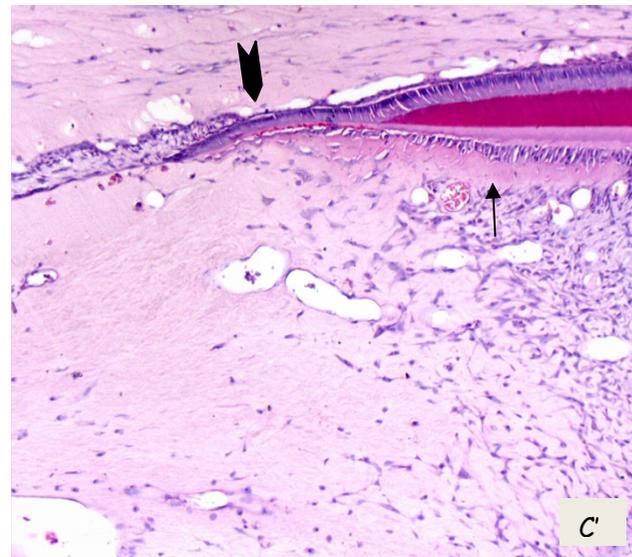
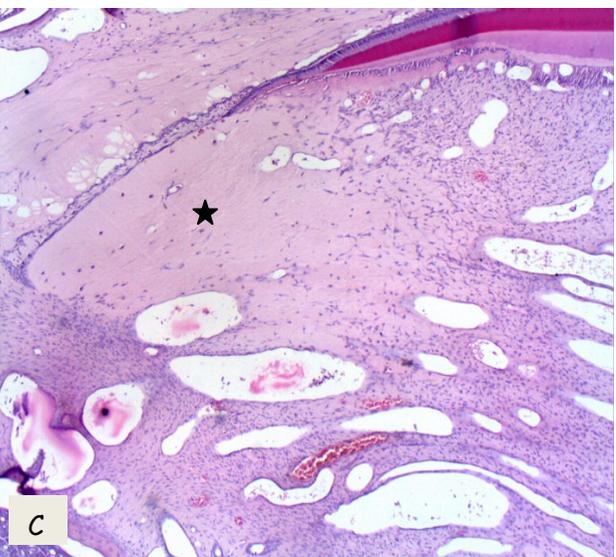
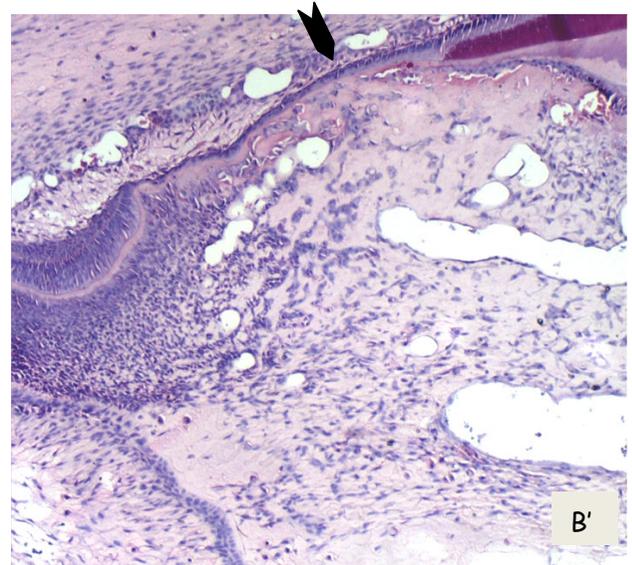
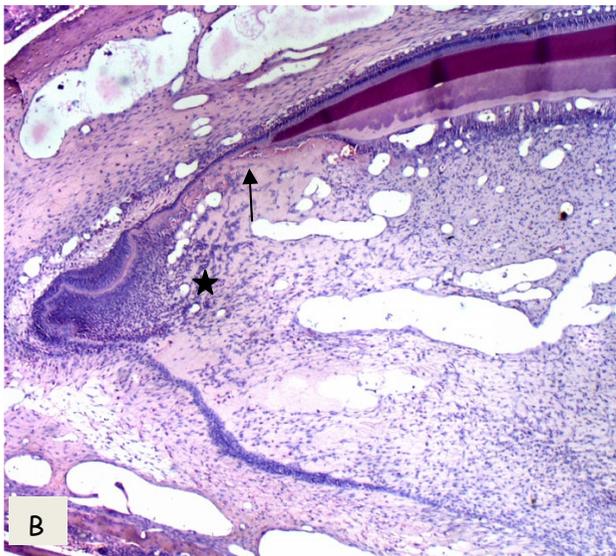
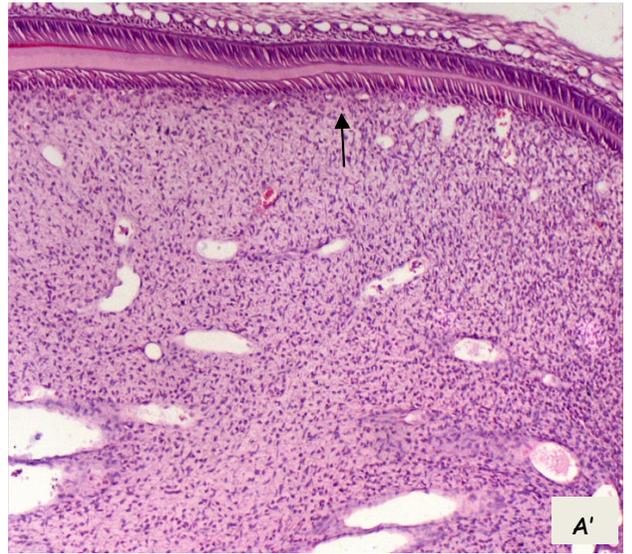


Figura 8- Cortes microscópicos (5µm) longitudinais de incisivo superior de ratos corados em HE. A- Controle indica tecido conjuntivo celularizado e organizado (estrela) e ameloblastos secretores preservados associados com fina camada de matriz orgânica do esmalte (seta larga) (x100); A'- Controle, odontoblastos paralelos com altura normal (seta) (x200); B- Irradiado 15Gy, desorganização das células do órgão odontogênico (estrela) e ausência de odontoblastos (seta) (x100); B'- Irradiado 15Gy, desorganização e diminuição da altura dos pré-ameloblastos (seta larga) (x200); C- Irradiado 25Gy, área de hialinização (estrela) (x100); C'- Irradiado 25Gy, redução da camada de odontoblastos (seta), desorganização e redução da altura dos pré ameloblastos (seta larga) (x200).

#### **5.4 Ultraestrutura do ameloblasto**

Pela análise das grades no grupo controle foi possível observar que os ameloblastos secretores apresentavam-se como células colunares altas, próximas umas às outras, conectadas por meio dos desmossomas e complexos juncionais. O núcleo apresentava forma ovóide e se localizava na região proximal da célula. No citoplasma foram encontradas numerosas organelas com formas preservadas, caracterizando uma ótima fixação e preparo das amostras avaliadas. Numerosas mitocôndrias estavam presentes na porção basal da célula (figura 9C), muitos retículos endoplasmáticos rugosos (figura 9A) foram vistos espalhados ou dispostos em fileiras paralelas, muitos se localizando apicalmente, na região distal da célula, próximo aos processos de Tomes. Os complexos de Golgi apresentavam-se bastante evidentes, associados a pequenas vesículas de secreção. Também foram encontradas estruturas filamentosas espalhadas no citoplasma (figura 11A). Os ameloblastos secretores apresentam na sua porção apical distintos prolongamentos, os processos de Tomes, estes estão associados com numerosas vesículas de exocitose (figuras 10A,C).

Nos grupos irradiados 15 e 25Gy foi possível observar retículos endoplasmáticos rugosos espalhados pela célula (figura 9B) e mitocôndrias normais, localizadas na porção basal da célula (figura 9D). Os filamentos

apareciam em grande quantidade e distribuídos pelo citoplasma (figuras 11B,C,D, 12A,B). Os processos de Tomes estavam presentes e alongados (figuras 10B,D).

Os achados mais importantes vistos nos grupos irradiados 15 e 25Gy foram as diversas áreas de degeneração, localizadas mais comumente no limite ameloblasto/matriz de esmalte (figuras 11C, 12C,D, 15C,D) e a presença dos autofagossomas (figuras 13A,B,C,D; 14A,B,C,D), que correspondem a degenerações contendo conteúdo citoplasmático. O retículo endoplasmático rugoso foi a organela degradada encontrada com maior frequência no interior dos autofagossomas. Os animais pertencentes ao grupo controle não apresentavam tais alterações. Também foram observados inúmeros lisossomos com material degradado em seu interior e o aparecimento de áreas de hialinização (figuras 15A, B), o que sugerem sinais de degradação da célula.

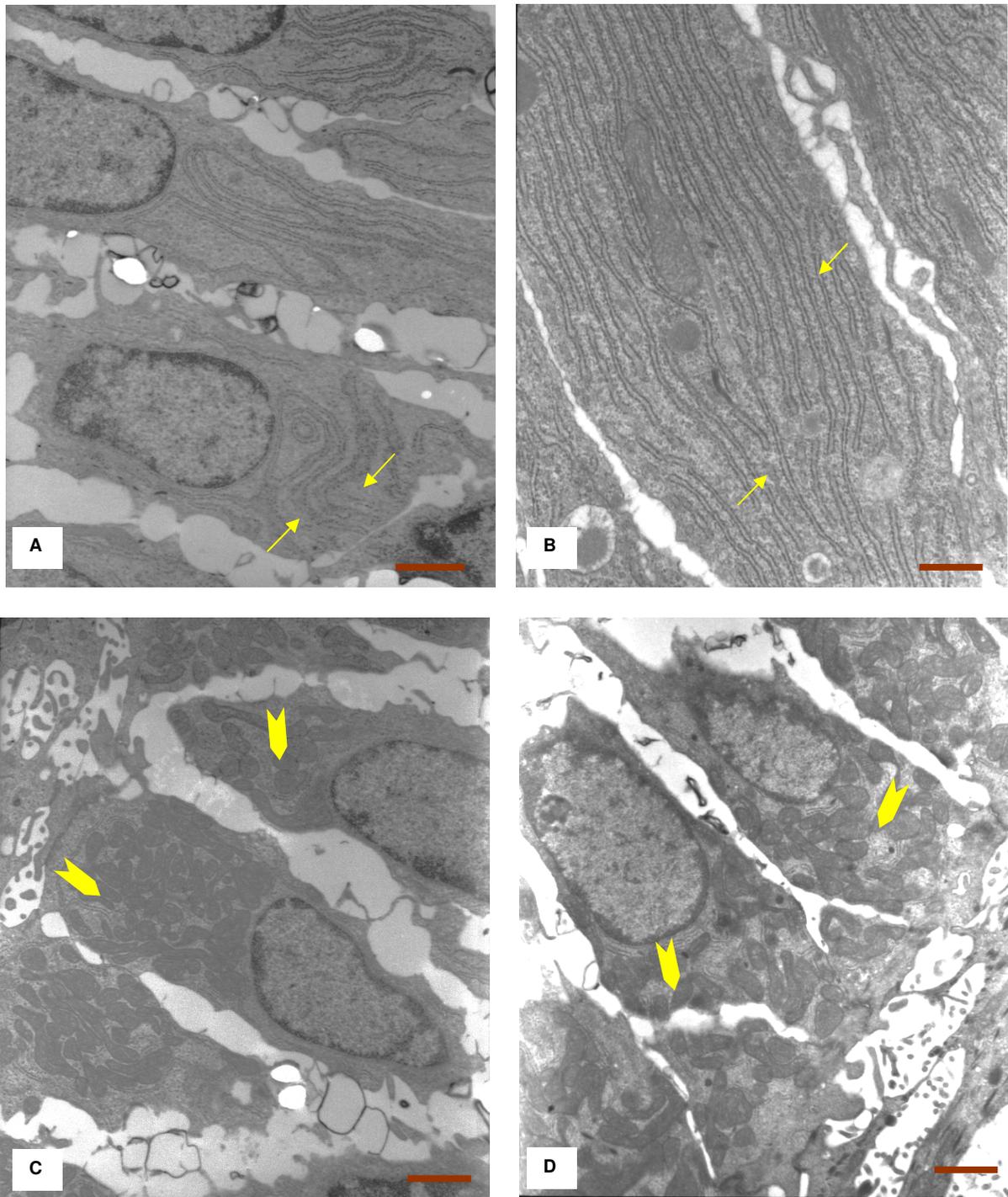


Figura 9- A, B Controle e Irradiado 25Gy, as setas indicam reticulo endoplasmático localizado na porção apical da célula (barra=0,61 $\mu$ m) e (barra= 0,48 $\mu$ m), respectivamente; C, Controle, setas largas indicam mitocôndrias íntegras e bem preservadas na porção basal do ameloblasto (barra= 0,71  $\mu$ m); D, Irradiado 15Gy, setas largas indicam mitocôndrias bem preservadas (barra=0,98  $\mu$ m).

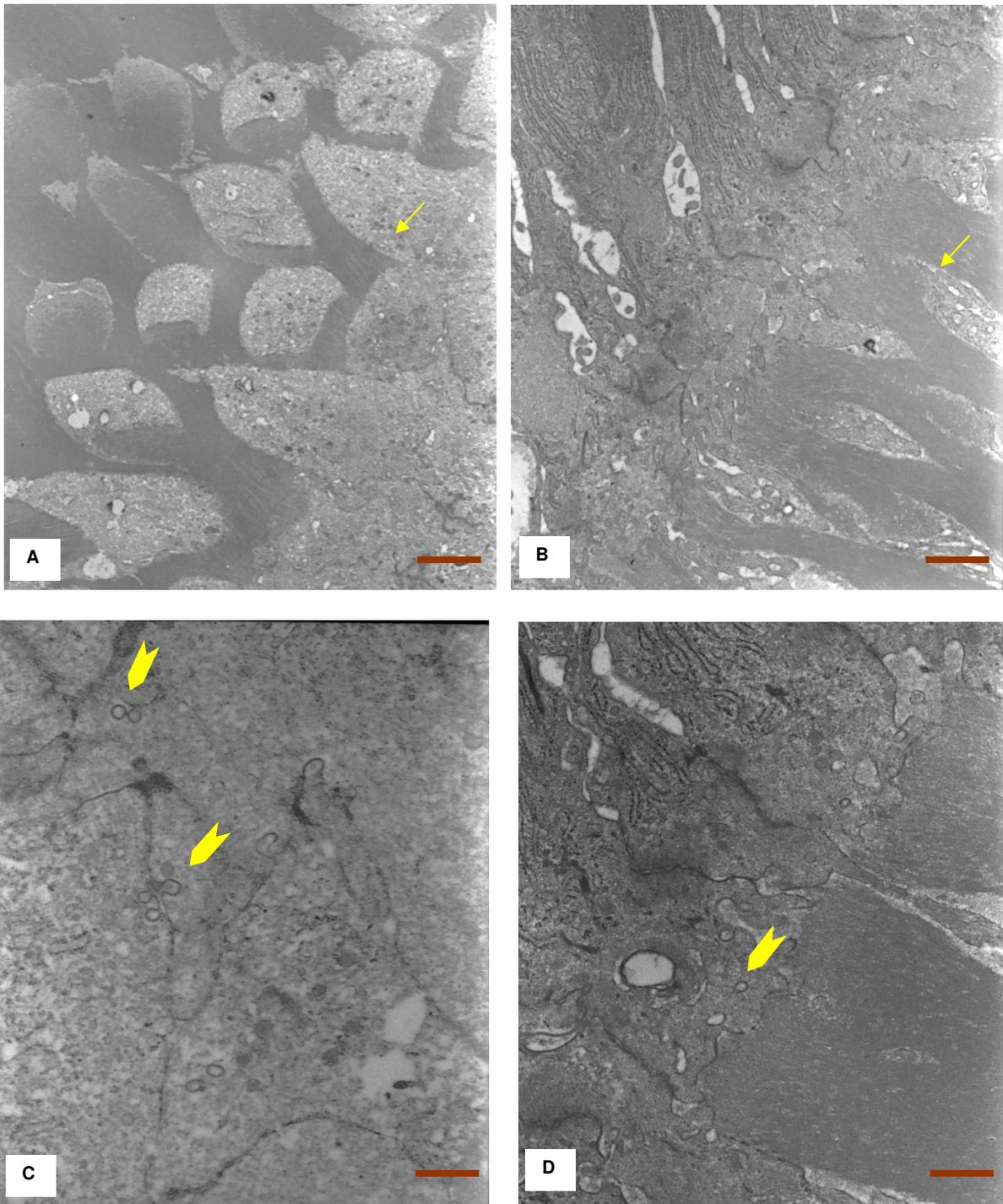


Figura 10- A, Controle, a seta indica processo de Tomes localizado na região apical do ameloblasto (barra= 1,61  $\mu\text{m}$ ); B, Irradiado 25Gy, a seta indica processo de Tomes (barra= 0,71  $\mu\text{m}$ ); C, Controle, setas largas indicam região de processo de Tomes e vesículas de exocitose (barra=0,98 $\mu\text{m}$ ); D, Irradiado 25Gy, setas largas indicam vesículas de exocitose apical (barra= 0,48 $\mu\text{m}$ ).

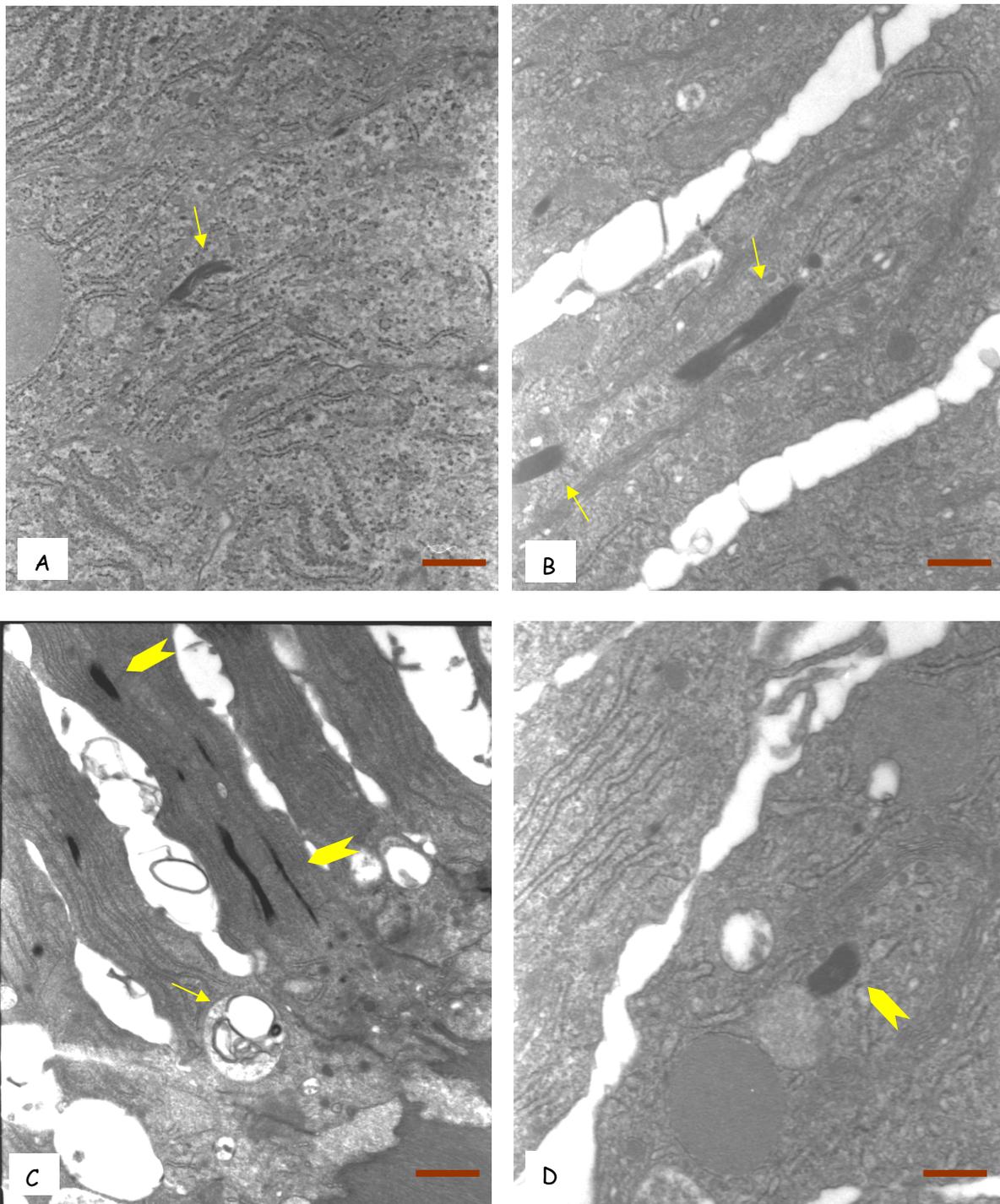


Figura 11- A, Controle, a seta indica tonofilamento (barra=0,61 $\mu$ m); B, Irradiado 15Gy, as setas indicam tonofilamentos (barra= 0,31 $\mu$ m); C, Irradiado 15Gy, setas largas indicam tonofilamentos localizados na região apical próximo aos processos de Tomes e seta uma área de degeneração (barra= 0,71  $\mu$ m); D, Irradiado 15Gy, seta larga indica tonofilamento (barra= 0,31  $\mu$ m).

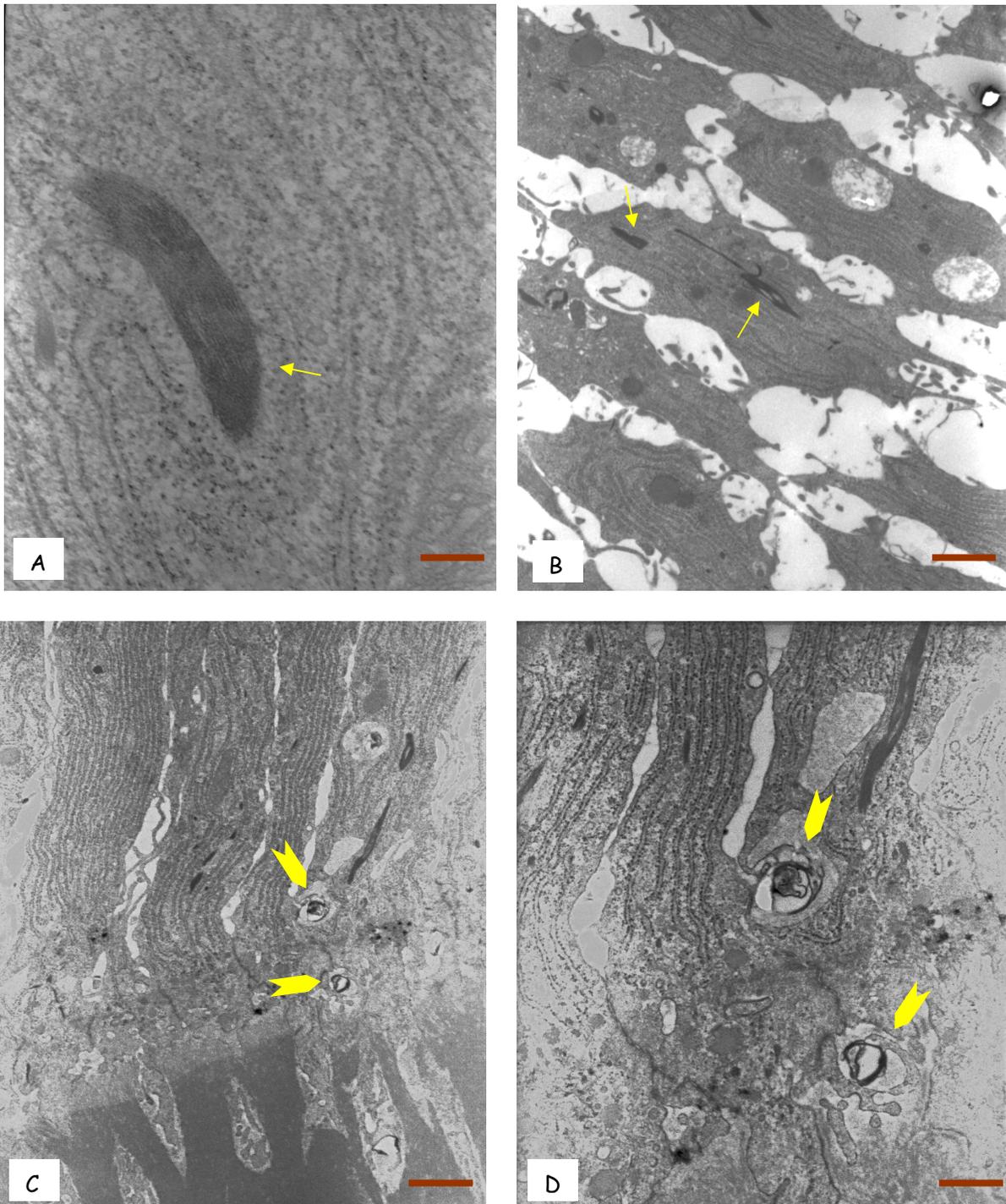


Figura 12- A, Irradiado 25Gy, a seta indica tonofilamento (barra=0,36 $\mu$ m); B, Irradiado 25Gy, as setas indicam tonofilamentos (barra= 1,14 $\mu$ m); C, Irradiado 25Gy, setas largas indicam limite entre ameloblasto e matriz do esmalte, com área de degeneração (barra=1,14  $\mu$ m); D, Irradiado 25Gy, setas largas indicam área de degeneração entre ameloblasto e matriz de esmalte (barra= tonofilamento (barra= 0,48  $\mu$ m).

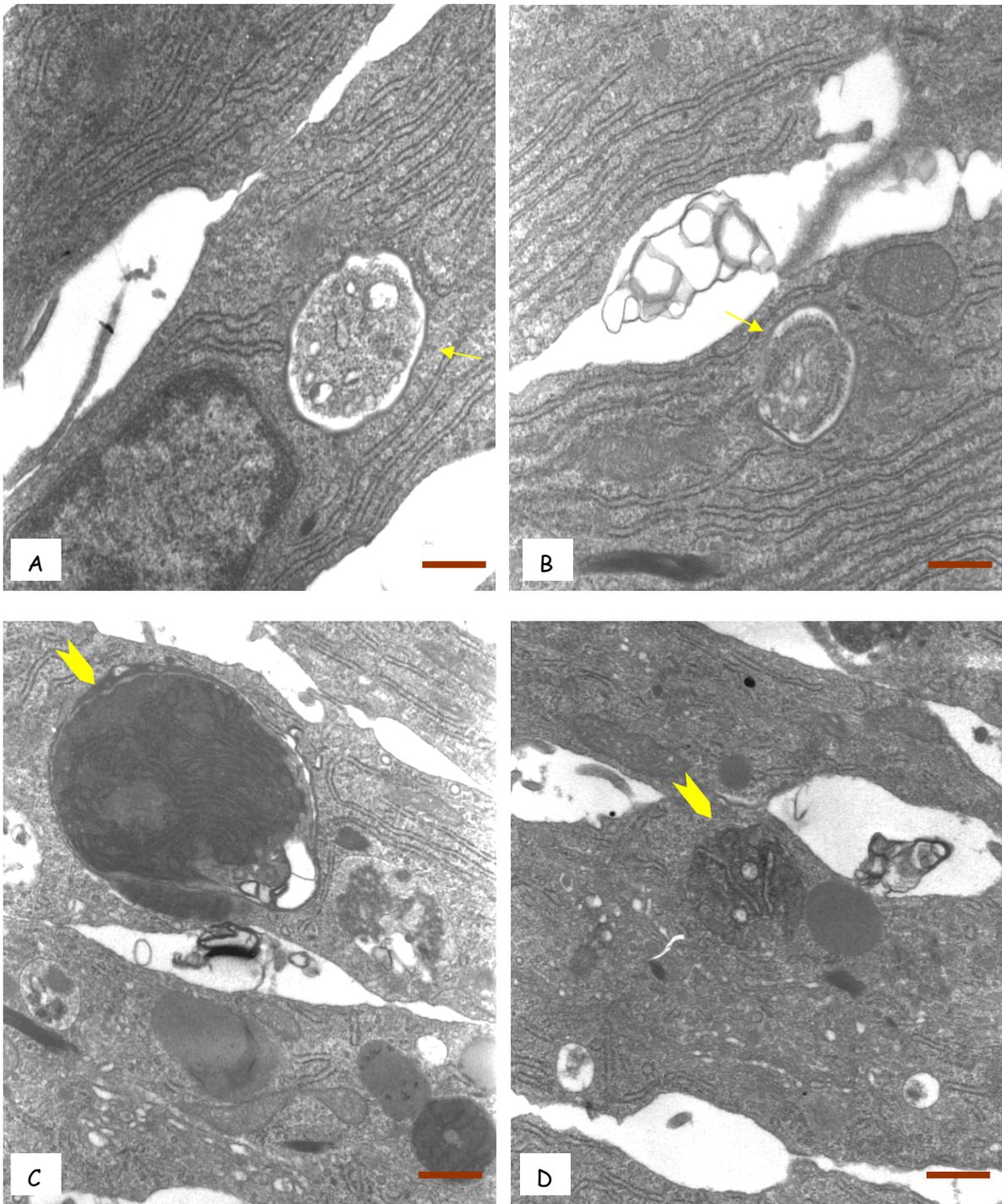


Figura 13- A, B Irradiado 15Gy, a seta indica autofagossoma (barra=0,36 $\mu$ m); C, D Irradiado 25Gy, setas largas indicam autofagossoma com retículo endoplasmático degenerado em seu interior (barra=0,48  $\mu$ m).

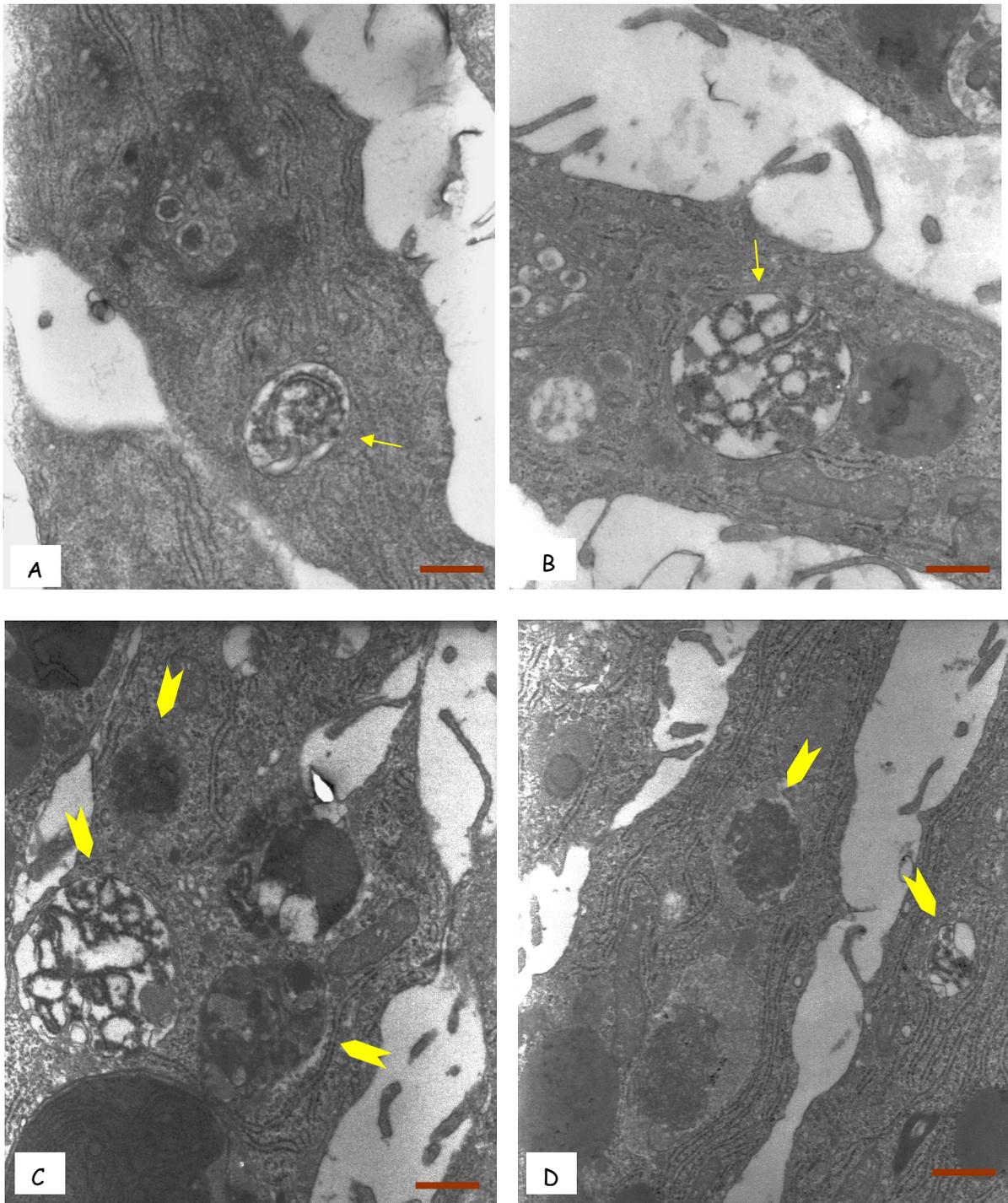


Figura 14- A, Irradiado 15Gy, a seta indica autofagossoma (barra=0,36 $\mu$ m); B, Irradiado 25Gy a seta indica autofagossoma (barra= 0,48 $\mu$ m) C, D Irradiado 25Gy, setas largas indicam áreas de alteração em ameloblasto (barra= 0,48 $\mu$ m).

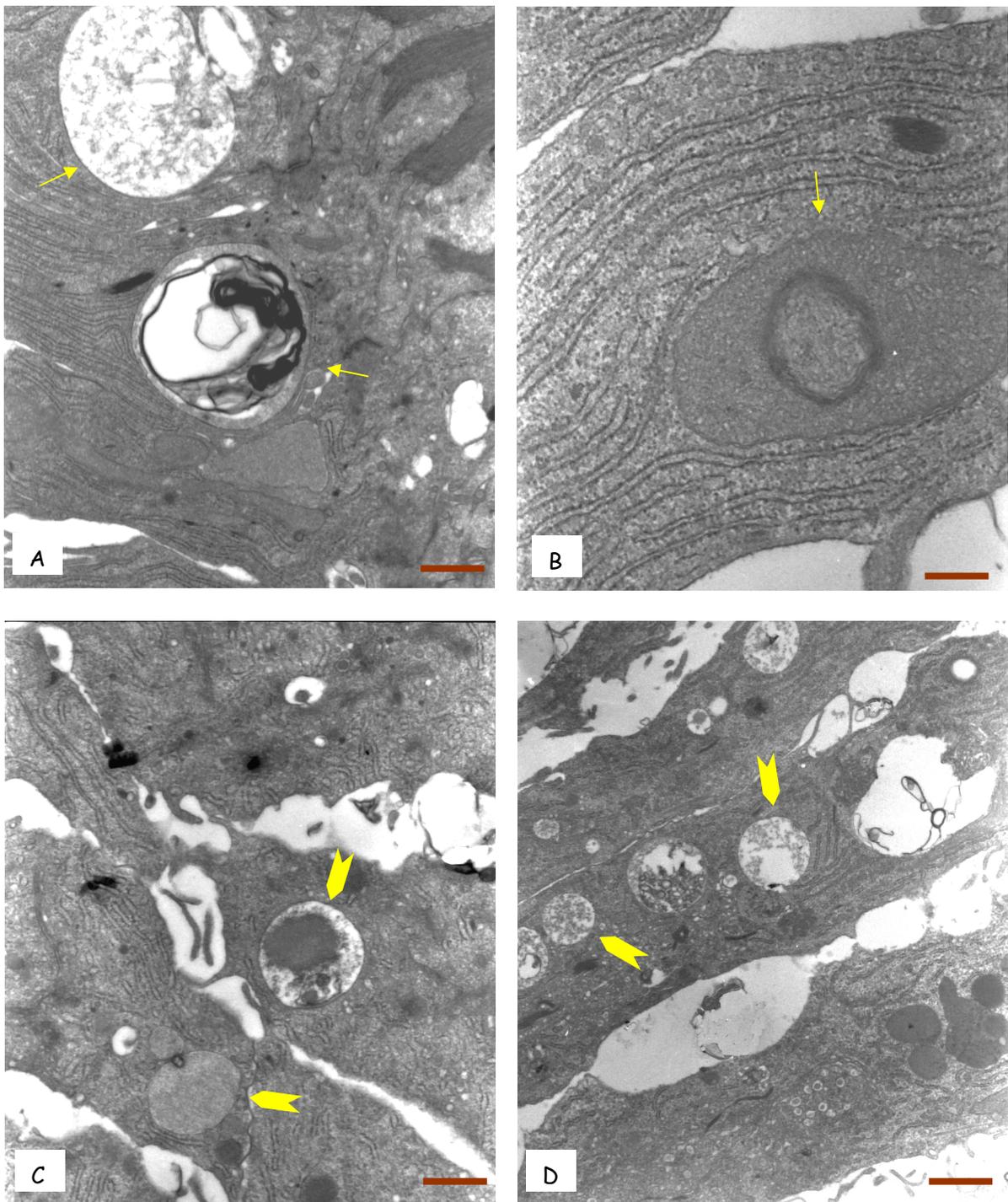


Figura 15- A, Irradiado 15Gy, a seta indica áreas de degeneração (hialinização) (barra= 0,61 $\mu$ m); B, Irradiado 15Gy, a seta indica área de início de hialinização (barra=0,25 $\mu$ m); C, D, Irradiado 15Gy e Irradiado 25Gy, respectivamente, setas largas indicam área de degeneração no ameloblasto (barra= 0,61 $\mu$ m) e (barra= 0,98  $\mu$ m).

## 6. DISCUSSÃO

Devido à complexidade do desenvolvimento dentário, aliado ao longo tempo que o mesmo leva para ser completado, diversos são os agentes externos que podem atuar nos dentes em formação, como por exemplo, a radiação ionizante utilizada para o tratamento de tumores malignos. Atualmente, o aumento da sobrevivência de pacientes portadores dessas neoplasias, nos despertou o interesse para conhecermos os possíveis efeitos agudos e crônicos da radioterapia nos dentes em desenvolvimento.

A maxila e a mandíbula podem ser expostas à altas doses de radiação durante o tratamento de tumores malignos na região de cabeça e pescoço. As complicações pós-radioterapia nos dentes permanentes são bem documentadas e o grau de severidade e a localização das lesões dentais vão depender do estágio da odontogênese que os dentes se encontram na época do tratamento, da dose e área irradiada (Lopes *et al.*, 2006). Assim, estudos avaliando o efeito da radiação na amelogênese são necessários, uma vez que alterações observadas na secreção da matriz orgânica podem acarretar defeitos na formação completa do esmalte, os quais podem comprometer a morfologia e função dentária.

Em nosso trabalho foram utilizadas doses agudas únicas de radiação de 15 e 25Gy, a fim de se avaliar e comparar a severidade dos defeitos causados por ambas as doses. Niehoff *et al.*, 2008, relataram, após cálculo utilizando um modelo quadrático linear, que uma dose única de 15Gy equivale à dose fracionada de 54 Gy (27 x 2Gy). Diversos autores são unânimes ao afirmarem que quanto maior a dose de radiação mais severas serão as alterações deletérias (Lindvall *et al.*, 1972; Pearson e Phelps, 1981; Lopes *et al.*, 2006).

Neste estudo, optou-se por utilizar o incisivo superior de ratos, pois esses dentes apresentam crescimento contínuo e suas células estão em constante renovação no órgão odontogênico ou progenitor, situado apicalmente, na região correspondente ao alvéolo dentário (Lindvall *et al.*, 1972). Nesta região apical ocorrem as rápidas divisões celulares e os odontoblastos e ameloblastos iniciam a formação de dentina e esmalte. Devido a esta constante proliferação celular, o

órgão odontogênico é uma região bastante radiosensível (Pearson e Phelps, 1981). 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 e Stokke, 1969). Ainda, de acordo com Koppang e Stokke, 1969, o incisivo superior é considerado o dente mais radiosensível.

Pelo fato do desenvolvimento dentário dos ratos ocorrer de maneira semelhante ao do ser humano, no que se refere aos tipos celulares e mecanismos de formação, este modelo de estudo (incisivo de rato) é muito utilizado, uma vez que podemos comparar os resultados com pesquisas realizadas em seres humanos na época de desenvolvimento dentário (Thesleff e Aberg, 1997).

Smith e Warshawsky, 1976, 1977, constataram, em incisivos superiores de ratos, que dois dias são o tempo decorrido para as células indiferenciadas da região odontogênica se diferenciarem em ameloblastos e, portanto iniciarem a secreção de matriz de esmalte, o mesmo sendo também observado aos quatro dias. Assim, os autores concluíram que estes ameloblastos demoram aproximadamente 156 horas na fase de secreção. De acordo com Espírito Santo *et al.*, 2006, na fase de secreção avançada de esmalte é onde se observa a maior birrefringência da matriz orgânica do esmalte. Os ameloblastos, além de sintetizarem e secretarem as amelogeninas e demais constituintes da matriz, também são responsáveis pela eventual reabsorção da matriz protéica. Esta tem sua degradação iniciada na fase de transição e é extensamente degradada e substituída por componente mineral na fase de maturação (Moradian-Oldak e Goldberg, 2005).

Sabe-se que defeitos na formação do esmalte são bastante comuns e podem acarretar numa maior susceptibilidade ao desenvolvimento da cárie, logo é de suma importância o estudo das possíveis alterações provocadas pela radiação sobre a formação deste tecido. A radioterapia durante a fase de formação dentária induz o aparecimento de diversas alterações coronárias e radiculares, tais como a presença de raízes curtas e cônicas, fechamento apical prematuro, coroas

dentárias pequenas, hipodontia, retenção prolongada dos decíduos e hipoplasia do esmalte (Dahllöf *et al.*, 1994; Kaste *et al.*, 1997).

A irradiação com 4Gy *in útero*, durante a fase de formação do germe dental de molares de ratos acarreta o aparecimento de alterações na coroa dental, como a redução no seu tamanho, fusão das cúspides e fraturas coronárias (Manzi, 2005).

Alterações na produção de esmalte também foram encontradas entre seis e sete dias após dose única de radiação de 16Gy (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.

Dentre os efeitos da radiação observados nos grupos irradiados com 15 e 25Gy, podemos citar na região odontogênica, a desorganização celular, associada à área de tecido hialino e amorfo. Adicionalmente, em ambos os grupos irradiados, a camada de pré ameloblastos estava com redução na sua altura e os odontoblastos muitas vezes ausentes ou pobremente organizados. Sweeney *et al.*, 1977 relataram ruptura do arranjo normal das células odontoblásticas e dano acentuado aos ameloblastos e odontoblastos, após doses fracionadas de 48 e 72Gy, respectivamente. Saad *et al.*, 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 4Gy de radiação *in utero* aos doze dias de gestação.

O brilho da birrefringência é bastante lábil, podendo ser, portanto, influenciado por vários fatores, tais como fixação inadequada, espessura do corte e uso de solução descalcificadora inadequada. Dessa maneira, os animais devem ser perfundidos e suas hemimaxilas rapidamente removidas e imersas em soluções fixadoras adequadas sob agitação (Espírito Santo *et al.*, 2006). Por isso, no presente estudo, os animais foram perfundidos com solução de Karnovsky (mistura de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5%), as hemimaxilas foram

rapidamente extraídas e fixadas, sob agitação, na mesma solução, garantindo uma ótima preservação tecidual. A descalcificação foi realizada com formaldeído 4% e ácido nítrico 5% por vinte e quatro horas, permitindo a rápida remoção do conteúdo mineral, sem causar dano aos componentes teciduais.

Pela análise dos nossos resultados podemos observar que o grupo controle apresentou o maior valor de retardo óptico, ou seja, a matriz orgânica do esmalte apresentava-se fortemente birrefringente o que caracteriza um tecido altamente organizado à nível molecular, quando examinado no microscópio de luz polarizada. Uma diminuição não significativa no valor do retardo óptico foi vista no grupo 15Gy, quando comparado ao grupo controle. Uma redução significativa na birrefringência foi observada no grupo irradiado 25Gy, o que sugere uma diminuição na ordenação e organização supramolecular deste tecido, pois, de acordo com Espírito Santo *et al.*, 2007, os quais estudaram animais mutantes para os genes da amelogenina e enamelinina, constataram que o brilho da birrefringência da matriz orgânica do esmalte no estágio de secreção é influenciado pela organização ordenada supramolecular dos seus componentes. Os mesmos autores, no ano de 2006, citam ainda que o brilho da birrefringência é primeiramente observado no estágio precoce de secreção, porém as substâncias que compõem a matriz devem ser processadas para formar uma estrutura supramolecular altamente ordenada, gerando um forte brilho birrefringente.

A amelogenina é a principal proteína que compõe a matriz orgânica do esmalte, representando cerca de 90% do conteúdo protéico (Moradian-Oldak, 2001; Espírito Santo e Line, 2005). Essa proteína forma agregados globulares supramoleculares denominados nanosferas (Fincham *et al.*, 1995). Acredita-se que a configuração ordenada destes agregados seja o fator essencial para a formação e conseqüente brilho de birrefringência observado na fase de secreção avançada da matriz orgânica do esmalte (Fincham *et al.*, 1994; 1999). Outra função crucial é sua ação como importante indicador do controle da fase mineral, guiando o início do crescimento dos cristais de hidroxiapatita (Fincham *et al.*, 1994; Moradian-Oldak e Goldberg, 2005). Dessa forma, alterações na composição

e ordenação dessa matriz protéica podem acarretar severos distúrbios da mineralização. Veis, 2005, acrescenta que os espaços existentes entre os processos de Tomes são necessários para uma eficiente mineralização mediada pela matriz orgânica do esmalte.

As propriedades biomecânicas do esmalte maduro refletem a organização dos seus constituintes e sua organização é uma consequência direta da regulação provida pela matriz orgânica extracelular protéica do esmalte (Paine *et al.*, 2001).

Nossos resultados da medida da taxa de erupção aos dois dias nos mostraram que todos os grupos apresentaram crescimento semelhante, não diferindo entre si. Porém aos quatro e seis dias ambos os grupos irradiados (15 e 25Gy) mostraram redução significativa no crescimento dentário. Segundo Pearson e Phelps, 1981, após a irradiação, apesar do dano observado nas células progenitoras o dente continua a erupcionar. Quando a taxa de erupção foi acompanhada no período de uma, duas e três semanas, também foi possível observar diferenças significativas nos três tempos de avaliação entre os grupos controle e irradiado. Nossos achados concordam com Ubios *et al.*, 1992, os quais relataram redução significativa da taxa de erupção em molares de ratos jovens sessenta dias após dose de 20Gy de radiação X e com Niehoff *et al.*, 2008, que relataram diminuição do crescimento dentário do incisivo inferior duas semanas após uma dose de radiação localizada de 20Gy. Por outro lado, Sweeney, 1977, relatou que apesar de doses mais elevadas de radiação causarem danos aos ameloblastos, o uso de doses fracionadas de até 72Gy não causa nenhum efeito nos dentes erupcionados.

De acordo com Michaeli *et al.*, 1986 e Steigman, *et al.*, 1989, a taxa de erupção diária média em incisivos de ratos é de 0,4mm. Nossos resultados assemelham-se aos dos autores acima, uma vez que no grupo controle encontrou-se uma taxa de erupção diária de 0,41mm.

Como descrito por Smith e Warshawsky, 1976, 1977, as células provenientes da região odontogênica se transformam em ameloblastos diferenciados e começam a secretar esmalte em aproximadamente dois dias,

permanecendo na secreção por mais 156 horas. A diminuição no brilho da birrefringência por nós encontrada nas doses de 15 e 25Gy, apesar de não significativa para a dose de 15Gy, pode estar indiretamente relacionada à redução significativa da taxa de erupção aos quatro e seis dias. É possível que nestes grupos os ameloblastos tenham iniciado a secreção do esmalte aos dois dias, e devido à redução do crescimento dentário, não houve progressão nesta secreção ou então falha na organização supramolecular dessa matriz secretada, acarretando em valores mais baixos de birrefringência. Além disso, as alterações observadas podem ter sido produzidas devido a interferências na fase de desenvolvimento dentário, as quais acarretaram redução da atividade de alguns ameloblastos diferenciados, morte de outros e atraso na diferenciação de novos ameloblastos. Clinicamente, altas doses de radiação (18 e 24Gy) utilizadas no tratamento radioterápico em crianças acarretam severos distúrbios dentários como agenesia, interrupção do desenvolvimento radicular e displasia do esmalte, provavelmente devido a redução da taxa de erupção e deposição irregular de matriz de esmalte (Sonis *et al.*, 1990).

A avaliação ultraestrutural é de suma importância, pois dessa forma podemos analisar os sistemas de funcionamento celular com mais precisão. Como já descrito por Ribeiro *et al.*, 2006, no presente estudo também verificou-se que os ameloblastos secretores apresentavam-se como células altas próximas umas às outras com núcleo ovóide localizado na porção proximal das células. Diversas organelas citoplasmáticas íntegras foram observadas no grupo controle e nos irradiados (15 e 25Gy). De acordo com Mathiessen e Romert, 1980, a ultraestrutura do ameloblasto secretor de humanos difere do rato apenas na localização das mitocôndrias que neste último é na região proximal ou basal da célula. A localização preferencial das mitocôndrias na porção basal da célula descrita na nossa pesquisa também foi encontrada por outros autores (Slavkin *et al.*, 1976; Akita e Kagayama, 1985; Takano *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 2006). A localização basal e integridade das mitocôndrias também foi observada nos grupos irradiados 15 e 25Gy.

A presença das diversas estruturas filamentosas dispostas no citoplasma celular foram relatadas por Mathiessen e Romert, 1980 e Massa e Arana-Chavez, 2000. Segundo estes últimos autores, os filamentos estão em contato com diversas organelas citoplasmáticas e parecem estar freqüentemente associados aos microtúbulos, sendo possível que esses filamentos correspondam a proteína plectina já descrita em outros tecidos. Domingues *et al.*, 2000, estudando a expressão de citoqueratinas no órgão dental, afirmaram que a lâmina dentária e órgão do esmalte são formados por células epiteliais, as quais são caracterizadas pela presença de filamentos de citoqueratinas, as quais desempenham um papel importante nos tecidos de origem epitelial.

O retículo endoplasmático rugoso é observado em grande quantidade espalhado pelo citoplasma e próximo aos processos de Tomes (Mathiessen e Romert, 1980; Akita e Kagayama, 1985; Ribeiro *et al.*, 2006).

Logo após a formação da camada inicial de esmalte, os ameloblastos desenvolvem extensões citoplasmáticas apicais, denominadas processo de Tomes, os quais controlam o crescimento e orientação dos prismas de esmalte, além de caracterizar o ameloblasto em fase de síntese e secreção ativa (Takano *et al.*, 1990; Smith e Nanci, 1995). Na nossa pesquisa foi possível visualizar estes distintos prolongamentos apicais, associados a estruturas eletrodensas de formato arredondado, compatíveis com as vesículas de secreção ou exocitose. As vesículas de exocitose associadas a Tomes também foram reportadas por Slavkin *et al.*, 1976; Ribeiro *et al.*, 2006. A presença dos compartimentos ou complexo de Golgi conjuntamente com pequenas vesículas de secreção também conota a função secretória do ameloblasto. Sua presença foi apontada por Sasaki *et al.*, 1983, que juntamente com os lisossomos e retículo endoplasmático controlam as funções de síntese protéica. Ten Cate, 2001, resume de maneira bastante didática, a ultra-estrutura e processo de síntese protéica no ameloblasto secretor. A síntese de proteína ocorre no retículo endoplasmático rugoso, passa para o complexo de Golgi, ocorre a formação dos grânulos de secreção que migram para

a extremidade distal ou apical da célula, posteriormente ocorre o desenvolvimento dos processos de Tomes, que continuam com o processo de secreção.

As degenerações com conteúdo citoplasmático observadas em grande quantidade nos grupos irradiados chamadas de autofagossomas sugerem um processo de morte celular, fenômeno que pode ser encontrado em condições fisiológicas e patológicas (Bursch, 2001). No nosso estudo, a organela degradada encontrada com maior frequência foi o retículo endoplasmático rugoso. De acordo com Ogata *et al.*, 2006, o processo de autofagia ocorre na maioria dos tecidos e contribui para o *turnover* rotineiro dos constituintes citoplasmáticos da célula. No entanto, a autofagia pode ser induzida por alterações das condições ambientais, tais como a depleção nutritiva da célula. Os autores afirmam também que a formação dos autofagossomas é acelerada nas células sob estresse do retículo endoplasmático rugoso. Sasaki, 1983, relata que a presença dos vacúolos autofágicos é rara nos ameloblastos secretores. Várias investigações propuseram recentemente dois tipos de morte celular programada: a apoptose (tipo I), que exerce um papel parcial na morte das células epiteliais pela radiação e a autofagia (tipo II), que é caracterizada pela captura de um volume citoplasmático incluindo as organelas em vesículas autofágicas, também chamadas de autofagossomas (Paglin *et al.*, 2001). O grande número dos autofagossomas por nós encontrado nos grupos irradiados pode ser explicado de acordo com os achados de Peng *et al.*, 2008, que revelam que a autofagia é um processo de múltiplas etapas, que pode ser inicialmente desencadeado pela radiação. Posteriormente, estas vesículas contendo citoplasma e organelas irão se fundir aos lisossomos, gerando os autolisossomos, os quais serão degradados pela célula em seu sistema lisossomal próprio. Embora, como citado acima, os autofagossomas possam representar processos celulares fisiológicos, a ausência desse achado no grupo controle, permite-nos associar os autofagossomas aos efeitos deletérios da radiação.

Akita e Kagayama, 1985, reportaram a presença de vacúolos tipo fagossomas, além da fragmentação do retículo endoplasmático rugoso e

desorganização do complexo de Golgi quando estudaram a ultraestrutura dos ameloblastos de incisivos de ratos após perfusão vascular com colchicina, droga que inibe o ciclo celular e conseqüentemente a proliferação e diferenciação celular.

Nos grupos irradiados também foram visíveis inúmeros lisossomos com material degradado em seu interior e o aparecimento de áreas de hialinização. Tais alterações não foram encontradas no grupo controle. As diversas alterações celulares vistas por meio da microscopia eletrônica de transmissão nos ameloblastos secretores podem estar intimamente relacionadas às alterações na birrefringência da matriz orgânica do esmalte, seja por falha na secreção ou desorganização dos componentes protéicos da matriz.

Assim, associando estes achados à prática clínica, quanto mais cedo um paciente for submetido à radioterapia maior será o grau e severidade das lesões dentárias encontradas, podendo até apresentar interrupção na formação do dente.

## **7. CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que:

1. Altas doses de radiação X retardam a erupção dentária de incisivos de ratos a partir do quarto dia pós-irradiação.
2. Altas doses de radiação X causam diminuição no brilho de birrefringência da matriz orgânica do esmalte, na fase de secreção da amelogenese;
3. A incidência da radiação X sobre os tecidos odontogênicos provoca alterações significativas, com intensa desorganização dos seus componentes.
4. Nos ameloblastos irradiados, embora organelas celulares como retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexo de Golgi se apresentem preservadas, extensas áreas de degeneração são observadas, além da presença acentuada dos autofagossomas, indicando que altas doses de radiação ionizante causam agressão e modificam a ultraestrutura celular.

## REFERÊNCIAS\*

- Akita H, Kagayama M. Ultrastructure of mouse incisor ameloblasts after vascular perfusion with colchicine. *Cell Tissue Res.* 1985; 239(3): 567-574.
- American Cancer Society. Cancer facts & figures. [Acesso 2008 Julho 7]. Disponível em: <http://www.cancer.org>.
- Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2001; 8(6): 569-581.
- Dahllöf G, Rozell B, Forsberg CM, Borgström B. Histologic changes in dental morphology induced by high dose chemotherapy and total body irradiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 77(1): 56-60.
- Domingues MG, Jaeger MM, Araújo VC, Araújo NS. Expression of cytokeratins in human enamel organ. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(1): 43-47.
- Espírito-Santo AR, Line SRP. The enamel organic matrix: structure and function. *Braz J Oral Sci.* 2005; 4: 716-724.
- Espírito-Santo AR, Novaes PD, Line SRP. Anisotropic properties of the enamel organic extracellular matrix. *Eur. J. Oral Sci.* 2006; 114 (Suppl 1), 333-337.
- Espírito-Santo AR, Bartlett JD, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AS, Line SRP. Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. *Connect Tissue Res.* 2007; 48(1): 39-45.
- Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Diekwisch TGH, Layaruu DM, Wright JT, Bringas P *et al.* Evidence for amelogenin “nanospheres” as functional components of secretory stage enamel matrix. *J Struct Biol.* 1995; 115(1): 50-59.

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

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP, Sarte P, Lau EC, Diekwisch T, Slavkin HC. Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J Struct Biol.* 1994; 112(2): 103-109.

Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Terenziani M, and the Eurocare working group. Childhood cancer survival trends in Europe: a Eurocare working group study. *J Clin Oncol.* 2005; 23(16): 3742-3751.

Horn Y, Maikitziu A, Ulmansky M. Effect of single versus fractionated doses of x-radiation on incisor rats. *J Dent Res.* 1975; 54(2): 328-388.

Kaste SC, Hopkins KP, Jones D, Crom D, Greenwald CA, Santana VM. Dental abnormalities in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1997; 11(6): 792-796.

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): 211-214.

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.

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

Linnet MS, Ries LAG, Smith MA, Tarone RE, Devesa SS. Cancer Surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(12): 1051-1058.

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): 140-145.

Manzi FR. Efeito da radiação ionizante no desenvolvimento dentário em ratos [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP 76; 2005.

Massa LF, Arana-Chaves VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(1): 74-77.

Matsuo S, Takano Y, Wakisaka S, Ichikawa H, Nishikawa S, Akai M. Budding of small vesicles from the rough-surfaced endoplasmic reticulum in secretory ameloblasts of rat molar tooth germs. *Anat Record.* 1988; 222(4): 317-322.

Matthiessen ME, Romert P. Ultrastructure of the human enamel organ. II. Internal enamel epithelium, preameloblasts, and secretory ameloblasts. *Cell Tissue Res.* 1980; 205(3): 371-382.

McKee M, Warshawsky H. Quantitative analysis of rough endoplasmic reticulum approaches to the cell membrane in the secretory ameloblast of the rat incisor. *Anat Rec.* 1984; 209(3): 289-295.

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.* 2000; 45(4): 323-333.

Michaeli Y, Steigman S, Yitschaky M, Weinreb Jr M. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of rat incisors to altered eruption rates. *J Periodontal Res.* 1986; 21(1): 86-94.

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

Moradian-Oldak J, Goldberg M. Amelogenin supra-molecular assembly in vitro compared with the architecture of the forming enamel matrix. *Cells Tissues Organs.* 2005; 181(3-4): 202-218.

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 Craniomaxillofac Surg.* 2008; 36(4): 203-209.

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammaerback JA, Urano F, Imaizumi K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(24): 9220-9231.

Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 2001; 61(2): 439-444.

Paine ML, White SN, Luo W, Fong H, Sarikaya M, Snead ML. *Matrix Biol.* 2001; 20(5): 273-292.

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): 409-417.

Peng PL, Kuo WH, Tseng HC, Chou FP. Synergistic tumor-killing effect of radiation and berberine combined treatment in lung cancer: the

contribution of autophagic cell death. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 2008; 70(2): 529-542.

Ribeiro DA, Hirota L, Cestari TM, Ceolin DS, Taga R, Assis GF. Ultrastructural morphometric analysis of ameloblasts exposed to fluoride during tooth development. *J Mol Histol.* 2006; 37(8-9): 361-367.

Risnes S. A method of calculating the speed of movement of ameloblasts during rat incisor amelogenesis. *Arch Oral Biol.* 1979; 24(4): 299-306.

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): 385-388.

Sasaki T. Ultrastructure and cytochemistry of the Golgi apparatus and related organelles of the secretory ameloblasts of the rat incisor. *Arch Oral Biol.* 1983; 28(10): 895-905.

Slavkin HC, Mino W, Bringas P. The Biosynthesis and secretion of precursor enamel protein by ameloblasts as visualized by autoradiography after tryptophan administration. *Anat Rec.* 1976; 185(3): 289-312.

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

Smith CE, Warshawsky H. Movement of entire cell populations during renewal of the rat incisor as shown by radioautography after labeling with <sup>3</sup>H-thymidine. The concept of a continuously differentiating cross-sectional segment. (With an appendix on the development of the periodontal ligament). *Am J Anat.* 1976; 145(2): 225-259.

- Smith CE, Warshawsky H. Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. Evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. *Anat Rec.* 1977; 187(1): 63-98.
- Sonis AL, Tarbell N, Valachovic RW, Gelber R, Schwenn M, Sallan S. Dentofacial development in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia. A comparison of three treatment modalities. *Cancer.* 1990; 15; 66(12):2645-2652.
- Steigman S, Michaeli Y, Yitzhaki M, Weinreb M. A three dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J Dent Res.* 1989; 68(8): 1269-1274.
- Sweeney WT, Elzay RP, Levitt SH. Histological effect of fractionated doses of selectively applied 60Co irradiation on the teeth of albino rats. *J Dent Res.* 1977; 56(11): 1403-1407.
- Takano Y, Yamamoto T, Domon T, Wakita M. Histochemical, ultrastructural, and electron microprobe analytical studies on the localization of calcium in rat incisor ameloblasts at early stage amelogenesis. *Anat Rec.* 1990; 228(2): 123-131.
- 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.
- Thesleff I, Aberg T. Tooth morphogenesis and the differentiation of ameloblasts. *Ciba Found Symp.* 1997; 205: 3-12.
- Ubios AM, Piloni MJ, Cabrini RL. Mandibular growth and tooth eruption after localized x-radiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 50(2): 153-156.
- Urbano MTG, Nutting CM. Clinical use of intensity-modulated radiotherapy: part I. *The Brit J Radiol.* 2004; 77(914): 88-96.

Veis A. Materials science. A window on biomineralization. Science. 2005; 307 (5714): 1419-1420.

Warshawsky H, Smith CE. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. Anat Rec. 1974; 179: 423-446.

## ANEXO



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

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

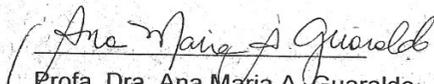
#### CERTIFICADO

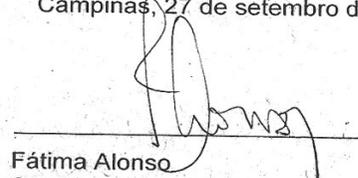
Certificamos que o Protocolo nº 1106-1, sobre "**ANÁLISE DA BIRREFRINGÊNCIA DA MATRIZ ORGÂNICA DO ESMALTE DENTÁRIO DE RATOS SUBMETIDOS A ALTAS DOSSES DE RADIAÇÃO**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Flávia Maria de Moraes Ramos**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 27 de setembro de 2006.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1106-1, entitled "**ANALYSIS OF THE BIREFRINGENCE OF THE DENTAL ENAMEL ORGANIC MATRIX FROM RATS SUBMITTED TO HIGH RADIATION DOSES**", 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 September 27, 2006.

Campinas, 27 de setembro de 2006.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA/IB - Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
Telefax: (19) 3521-6356  
E-mail: [ceea@cemib.unicamp.br](mailto:ceea@cemib.unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>