

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Flávia Maria de Moraes Ramos
Cirurgiã-Dentista

EFEITO RADIOPROTETOR DA VITAMINA E (acetato alfa-
tocoferol) NA FUNÇÃO SALIVAR DE RATOS.

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

Piracicaba
2005

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Flávia Maria de Moraes Ramos
Cirurgiã-Dentista

EFEITO RADIOPROTETOR DA VITAMINA E (acetato alfa-
tocoferol) NA FUNÇÃO SALIVAR DE RATOS.

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

Banca examinadora: Prof^a. Dra Mari Eli Leonelli de Moraes
Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes
Prof^a. Dra Solange Maria de Almeida

Piracicaba
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

R147e	Ramos, Flávia Maria de Moraes. Efeito radioprotetor da vitamina E (acetato alfa-tocoferol) na função salivar de ratos. / Flávia Maria de Moraes Ramos. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2005. Orientador: Pedro Duarte Novaes Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Radiação ionizante. 2. Glândulas salivares. 3. Protetores contra radiação. 4. Vitamina E. I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	---

Título em inglês: Radioprotective effect of vitamin E (alpha tocopherol acetate) in salivary function in rats

Palavras-chave em inglês (Keywords): Radiation, ionizing; Salivary glands; Radiation-protective agents; Vitamin E

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Mestre em Radiologia Odontológica

Banca examinadora: Mari Eli Leonelli de Moraes; Pedro Duarte Novaes; Solange Maria de Almeida

Data da defesa: 21/02/2005

Dedico este trabalho

A Deus e Nossa Senhora, presenças constantes em minha vida, fontes de luz, serenidade, força, confiança e paz.

A minha família:

Meus Pais, João e Gislaine, por não medirem esforços para me educar e realizar todos os meus sonhos. São exemplos de dedicação e doação pelos filhos. Amo vocês.

Meus queridos e amados irmãos João, Fabíola, Giselle e Alexandre. Sou alucinada por vocês.

Minhas avós, Irene e Josefa (Bé), exemplos de amor e doação incondicional. Não saem do meu coração.

Meus sobrinhos, Hugo, Gabriel e Luiza, bênçãos de Deus que transformaram nossas vidas.

Sem o AMOR de vocês eu não teria conquistado nada. Sou apenas o fruto de tudo aquilo que recebi da minha família. Vocês são os grandes responsáveis pelos objetivos por mim alcançados.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Eu acredito que Deus traz certas pessoas para nossas vidas por alguma razão. Às vezes é para nos ajudar a ver algo de novo e maravilhoso. Às vezes para nos encorajar e fortalecer. Outras vezes para nos lembrar de que nunca estamos sozinhos, e que é importante partilhar com os outros nossos sorrisos, sonhos e até mesmo nossas lágrimas.

Professor Dr FRAB NORBERTO BÓSCOLO, pela dedicação, carinho, amizade e ensinamentos transmitidos. Muito mais do que apenas Mestre, é amigo dos seus alunos e os têm como filhos. Não vou esquecer os conselhos e atenção a mim dispensados. És um exemplo de capacidade e liderança que pretendo seguir ao longo da minha vida profissional.

Professora Dra SOLANGE MARIA DE ALMEIDA, não tenho palavras para agradecer por tanta atenção, amizade, disponibilidade e conhecimentos. Além de exemplo de profissional, é dotada de um enorme coração. Seu sorriso constante fez o meu dia a dia se tornar muito mais suave. Muito Obrigada por acreditar em mim.

Professor Dr PEDRO DUARTE NOVAES, por sua preciosa orientação e dedicação durante a realização deste trabalho. Sua calma e paciência foram imprescindíveis para o meu aprendizado.

Professor Dr FRANCISCO HAITER NETO, por toda sabedoria, amizade e conhecimentos. Ensina os seus alunos a serem críticos e os forma verdadeiros profissionais.

Professor Dr MÁRIO ROBERTO VIZIOLI pela experiência e disponibilidade em nos ajudar. Minha eterna admiração.

Meu DANYEL, tu és uma verdadeira fonte de amor, compreensão e felicidade em minha vida. Uma pessoa iluminada e dotada de qualidades ímpares. Não tenho como te agradecer pela força, orientação e carinho. O nosso Amor é mesmo grandioso.

AGRADECIMENTOS

Professora CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY, pela dedicação e ajuda para realização das análises bioquímicas deste trabalho.

Professora GLÁUCIA MARIA BOVI AMBROSANO pela disposição e imprescindível ajuda para realização das análises estatísticas.

Aos grandes mestres por me transmitirem nobres ensinamentos para minha formação: Sônia Fonteles, Sueli Oliveira, Meus Professores do HRAC-USP (Centrinho) e Professor Max. Minha gratidão.

Ao Centro de Diagnóstico Boris Berenstein, nas pessoas de Dr. Jacob Berenstein e Dr. Marco Frazão pelo incentivo e apoio. É muito bom fazer parte dessa equipe.

Aos meus grandes e eternos amigos, Andréa Miranda, Girleide, Cledson, Fabíola, Sofia, Rafaela e Juliana. Amigos são como irmãos que escolhemos para permanecerem para sempre em nossas vidas.

Às minhas amigas Déa Pontual, Débora Nunes, Juliana Almeida, Etienne, Maria Luíza, Karina, Juliana Bittar, Adriana Dibo, Anna Sílvia e Karlinha que fizeram da minha estada em Piracicaba muito mais agradável. É muito bom saber que posso contar com vocês.

A todos os colegas da pós-graduação da FOP, em especial, aos amigos Mauro, Flávio Manzi, Fábio Guedes, Fabrício, Lúcio Kurita, Andréa Domingos, Mariliani, Melissa, Luciane, Ellen, Maria, Marcelle, Lila, Bruno, Rodrigo, Marcelão, Cris, Silvana, Alexandre, Chico, Jorge Esquiche, Lucielma, Andréia e Carola pela amizade e momentos de descontração.

Aos meus amigos da Radiologia da FOSJC, em especial, Marcinha e Luizinho pela grande amizade.

Aos funcionários da Radiologia, Roberta, Giselda, Waldeck, Antônio e Fernando, sempre tão dedicados. Muito Obrigada.

À disciplina de Histologia, em especial Cidinha e Eliene, pela disponibilidade em me auxiliar.

À disciplina de Bioquímica por terem cedido gentilmente o laboratório para realização das análises.

À disciplina de Fisiologia pela ajuda e disponibilidade no fornecimento de parte do material utilizado neste trabalho.

Aos funcionários da FOP, em especial Dona Zuleica (Biotério), sempre dispostos a ajudar.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa do Sr. Diretor Prof Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.

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

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me
esconder. Prefiro ser feliz, embora
louco, que em conformidade viver "*

Martin Luther King

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
1 Introdução e Revisão da Literatura	3
2 Proposição	20
3 Capítulo 1	21
Evaluation of Radioprotective effect of Vitamin E in salivary dysfunction in irradiated rats	42
4 Conclusão	
Referências	43
Anexos	47

RESUMO

O objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito radioprotetor da vitamina E na função das glândulas salivares por meio da medida do volume de saliva, bem como analisar a concentração de proteína total. Foram utilizados 90 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), os quais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: controle, que corresponde ao grupo em que os animais receberam óleo de oliva; óleo/irradiado, grupo no qual os animais receberam óleo de oliva e foram irradiados com dose única de 15 Gy de radiação gama na região de cabeça e pescoço; irradiado, grupo no qual os animais foram irradiados com dose única de 15Gy de radiação gama; vitamina E corresponde ao grupo em que os animais receberam solução de acetato de alfa tocoferol (vitamina E) mas não foram irradiados e vitamina E/irradiado, no qual os animais receberam solução de acetato de alfa tocoferol (vitamina E) antes de serem irradiados com dose única de 15Gy. Os animais foram sacrificados no tempo de 4 horas, 8 horas e 30 dias após a irradiação. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos de 4 e 8 horas. Aos 30 dias, o volume salivar dos animais do grupo óleo irradiado estava diminuído significativamente em relação ao grupo controle. Os animais do grupo irradiado apresentaram volume de saliva significativamente menor quando comparado com os grupos controle, vitamina E e vitamina E/irradiado, os quais apresentaram volumes de saliva similar. Na composição da saliva não houve diferenças significativas no conteúdo de proteína total entre os grupos estudados. Os constituintes medidos mostraram reduções significativas apenas 4 horas após a irradiação para todos os grupos examinados. Podemos concluir que a radiação não exerceu nenhum efeito no conteúdo de proteína total da saliva dos ratos irradiados e que a vitamina E protegeu a função salivar 30 dias após a irradiação, desta forma podemos considerá-la como um radioprotetor em potencial.

Palavras Chave: radiação ionizante, glândulas salivares, protetores contra radiação, vitamina E.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the radioprotective effect of vitamin E in salivary gland function by salivar volume measurements, as well as analize the total protein concentration. For this purpose 90 male rats (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar) were used and randomly divided in 5 experimental groups: control (I), which animals received olive oil; irradiated olive oil (II), group that the animals received olive oil and were irradiated with a single exposure dose of 15 Gy of gamma rays to the head and neck region; irradiated (III), which animals were only irradiated with a single exposure dose of 15 Gy of gamma rays; vitamin E (IV), correspond to the group which animals received α tocopherol acetate solution but were not irradiated; irradiated vitamin E (V), which animals received α tocopherol acetate solution before irradiation with a single exposure dose of 15 Gy gamma rays. The animals were sacrificed 4, 8 hours and 30 days after the irradiation procedure. We did not observe differences between the groups at 4 and 8 hours. At 30 days, the salivar volume in the animals pertaining to the irradiated olive oil group was significantly reduced in relation to the control group. The irradiation group presented salivar volume significantly diminished when compared to the control (I), vitamin E (IV) and irradiated vitamin E (V), which presented salivar volumes similar. In the salivar composition we did not observe significant differences in the total protein content between the groups studied. The constituents measured showed significant reductions only 4 hours for all the groups examined. We conclude that the radiation did not exert any effect in the total protein content of saliva in the irradiated rats and vitamin E protected the salivary function 30 days after irradiation. Thus, we can consider vitamin E as a potential radioprotective substance.

Key Words: ionizing radiation, salivary glands, radiation-protective agents, vitamin E.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A irradiação para tratamento de malignidades na região de cabeça e pescoço é comumente utilizada e freqüentemente resulta em complicações orais incluindo a perda de paladar, cáries dentárias, ulceração da língua e mucosa oral, além da sensação de boca seca ou xerostomia.

As glândulas salivares, muitas vezes, estão incluídas no campo de tratamento, o que acarreta injúria inevitável aos seus tecidos. Dependendo da dose e volume de tecido irradiado podem ser observadas alterações funcionais como a diminuição do fluxo salivar e a modificação da composição da saliva dentro da primeira semana de tratamento (Funegard *et al.*, 1994).

A qualidade de vida do paciente durante e após o tratamento é bastante importante. As equipes médicas e odontológicas, juntamente com o paciente, estão igualmente preocupadas com as seqüelas que o tratamento radioterápico pode produzir.

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

A terapia nutricional pode exercer grandes melhorias, minimizando os efeitos adversos produzidos pelo tratamento anti-neoplásico, incluindo o tratamento radioterápico. Algumas substâncias, como as vitaminas A, C e E, podem diminuir a ação dos radicais livres formados após a radiação, sendo denominadas de substâncias radioprotetoras.

1.1 Efeitos da radiação ionizante no fluxo salivar

Em 1981, Mossman *et al.* estudaram o efeito da radioterapia no fluxo salivar, na concentração de proteínas e na atividade de amilase salivar na glândula parótida de humanos submetidos à radioterapia com radiação γ por ^{60}Co . A análise da concentração de proteína total foi realizada por três métodos, os quais refletem diferentes propriedades de cada tipo de proteína. A avaliação foi realizada antes da radioterapia e em intervalos semanais. Os pacientes foram divididos em 03 grupos: irradiado, incluindo no campo de tratamento as glândulas parótidas (A); irradiado sem englobar a região da parótida (B) e o grupo controle não irradiado (C). Foi possível observar que antes do tratamento todos os parâmetros avaliados encontravam-se similares aos do grupo controle normais. No grupo A houve diminuição significativa no fluxo salivar e na taxa de proteína total na 1ª semana de tratamento. Para o grupo B a taxa de fluxo salivar, proteína total e atividade de amilase foram similares aos do grupo C antes e após 3 semanas de tratamento. Os autores sugerem que as proteínas salivares da parótida não são igualmente afetadas pelo tratamento radioterápico e que o método empregado mede diferentes características das moléculas protéicas.

Vissink *et al.*, 1990, avaliaram a relação dose-efeito na taxa de secreção salivar e na concentração de sódio, potássio, cálcio, fosfato e amilase nas glândulas parótida e submandibular/sublingual de ratos após doses únicas que variaram de 5 a 20 Gy. Em todos os grupos a saliva foi coletada 4 dias antes, 1, 3, 6, 10 e 20 dias após a irradiação. A extensão das alterações observadas na quantidade e no conteúdo da saliva foi dependente tanto da dose de radiação quanto do tempo pós-irradiação para ambas as glândulas. A concentração de sódio diminuiu após doses de 10-20 Gy, ao contrário da concentração de potássio que aumentou para todos os ratos irradiados tanto na parótida quanto na

submandibular. Nenhuma relação dose-resposta clara foi observada para as concentrações de cálcio e fosfato. Uma observação notável foi a grande similaridade na resposta funcional tanto da parótida quanto da submandibular após a irradiação.

Levando-se em consideração a dose e a capacidade de recuperação das células acinares, Vissink *et al.*, 1991, avaliaram o efeito da dose única de 15 Gy de radiação X comparada com duas doses fracionadas de 7,5 Gy administradas em intervalos de tempo variáveis de 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 168 horas, a fim de se determinar o dano precoce (0-6 dias) e tardio (6-30 dias) na função das glândulas salivares parótida e submandibular/sublingual de ratos após a radiação. A maior redução da função foi encontrada 30 dias após uma dose única de 7,5 e 15 Gy, sendo estatisticamente significativa apenas com 15Gy; a taxa de secreção, assim como a concentração de sódio e potássio estavam reduzidas tanto na parótida quanto na submandibular/sublingual. Nas doses fracionadas foi observada menor alteração nos tempos precoce e tardio, no fluxo salivar da parótida e submandibular nos intervalos de 2 -12 horas, com uma redução mínima no fluxo salivar no intervalo de 6 horas. Entretanto, foi possível observar que os conteúdos de sódio e potássio estavam mais preservados tardiamente. De forma similar ao fluxo salivar, a dose de radiação fracionada provocou uma menor alteração nos níveis de sódio e potássio no intervalo de 6 horas para ambas as glândulas. Os autores concluíram que as alterações agudas radioinduzidas na taxa de secreção e composição da saliva podem ser reduzidas pelo fracionamento da dose, sendo que no intervalo de 6 horas foram observados os melhores resultados.

Franzen *et al.*, 1992, avaliaram os efeitos de diferentes doses de radiação na função da glândula parótida de pacientes que se submeteram à radioterapia para malignidades na região de cabeça e pescoço. Os grupos foram divididos de

acordo com a dose recebida, sendo que o primeiro recebeu menos que 46 Gy, o segundo entre 47-52 Gy e o terceiro com dose total de 65 Gy ou mais. As amostras de saliva foram coletadas antes e semanalmente durante o curso do tratamento radioterápico. Inicialmente, já na primeira semana de tratamento, uma diminuição evidente na taxa de secreção salivar foi observada nos três grupos. As alterações encontradas ao final da radioterapia no 1º grupo foram continuamente melhoradas durante o acompanhamento de 18 meses. No 2º grupo a taxa de secreção salivar média foi de 21% e 25% em relação ao valor inicial, respectivamente aos 6 e 12 meses após o final do tratamento. Doses a partir de 65 Gy causaram depressão irreversível na função de uma vasta maioria de glândulas irradiadas.

Nagler *et al.*, 1993a, descreveram os parâmetros funcionais e a quantidade de proteína total, de sódio e de potássio para as glândulas parótida e submandibular durante as primeiras 24 horas após uma dose única de radiação X de 15 Gy na região de cabeça e pescoço. Na parótida o fluxo salivar diminuiu tanto no grupo controle quanto no irradiado 0,5 a 4 horas após a irradiação, porém esta diminuição não foi estatisticamente significativa. Em 24 horas houve uma recuperação do fluxo salivar no grupo controle, porém no grupo irradiado a secreção salivar se apresentava significativamente reduzida. A quantidade de proteína total para a glândula parótida não diferiu entre os grupos controle e irradiado nos tempos avaliados. A concentração de sódio diminuiu inicialmente (1 hora) em ambos os grupos, daí em diante os valores aumentaram no grupo controle enquanto que no irradiado permaneceram reduzidos. Os valores para a concentração de potássio foram similares entre os grupos em todos os tempos, com exceção das 4 horas no qual a concentração no grupo irradiado estava significativamente aumentada. Não houve diferenças significativas na taxa do fluxo salivar e nos constituintes químicos da saliva para a glândula submandibular entre os grupos irradiados e controle em qualquer dos tempos estudados.

No mesmo ano, 1993b, Nagler *et al.* examinaram os efeitos de diferentes doses de radiação nas glândulas salivares maiores de ratos. Foram medidos os pesos glandulares total, peso corpóreo e saída de fluxo salivar no 3º e 40º dia após a irradiação com exposição aguda única de 2,5; 5; 7,5; 10 e 15 Gy de radiação. Houve uma redução tanto no peso das glândulas parótida e submandibular, quanto no peso corporal dos animais nos dois tempos avaliados, que se comportaram de maneira dose dependente. Foi observada também uma redução dose dependente na função da parótida 3 dias após a irradiação, sendo esta significativa somente com a dose de 15 Gy, em que o fluxo salivar foi reduzido em 69%. Na glândula submandibular, entretanto, não foi observada redução. No 40º dia, a redução no fluxo salivar estava presente em ambas as glândulas. Com uma dose de 15 Gy, o fluxo salivar da parótida foi reduzido em 56% quando comparado com o grupo controle. A redução máxima na função da submandibular foi encontrada com uma dose de 10 Gy, havendo diminuição de 56% quando comparada com o grupo controle.

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

Nagler *et al.*, em 1996, avaliaram os efeitos da restrição da ingestão de água e ração na função salivar das glândulas parótida e submandibular/sublingual de ratos num período de duas semanas após exposição a uma dose única de 15 Gy de radiação X. O peso corpóreo e o fluxo salivar estimulado foram medidos 4, 8, 11 e 14 dias após a irradiação. Os animais foram divididos em 03 grupos: controle, irradiado e não irradiado cuja alimentação era semelhante àquela dos animais do grupo irradiado. Foi observado que o peso dos animais irradiados, bem como dos animais não irradiados, cuja alimentação era restrita, foi significativamente menor que o peso dos animais do grupo controle. O grupo controle apresentou ganho contínuo de peso nos dias do experimento. Os ratos irradiados e não irradiados cuja alimentação era restrita mostraram uma significativa redução do fluxo estimulado da parótida quando comparado com o grupo controle no 4º, 8º e 11º dia. No 14º dia foi observado um aumento na função salivar, e este não diferiu significativamente do grupo controle. Em geral, a função salivar da glândula submandibular/sublingual não foi significativamente afetada nos grupos avaliados, apenas o fluxo total do grupo irradiado no 11º dia foi significativamente menor do que no grupo controle. Os resultados desse trabalho sugerem que os efeitos precoces nas glândulas salivares são em parte resultantes da capacidade limitada de ingestão após a irradiação.

Nagler *et al.*, 1997a, examinaram a relação dose de radiação-resposta através da análise química da saliva das glândulas parótida e submandibular de ratos 3 e 40 dias, 3 e 9 meses após doses únicas de 2,5; 5; 7,5; 10 ou 15 Gy de radiação X. Em todos os tempos examinados houve uma redução dose-dependente na concentração de proteína na parótida e nenhuma alteração notável na glândula submandibular. Uma redução dose-dependente do padrão de atividade de amilase foi demonstrada nos 3º e 40º dias pós-irradiação, sendo mais pronunciado no terceiro dia. Com relação aos eletrólitos, uma redução dose-dependente para concentração de sódio na saliva foi encontrada no 3º e 40º dias

para a parótida e no 40° para a glândula submandibular. A concentração de potássio também estava alterada após a irradiação, porém em menor extensão e apenas na glândula parótida.

Coopes *et al.*, 1997, revisaram o conceito da degranulação dos ácinos avaliando a função das glândulas salivares após 1, 3, 6, 10 e 30 dias pós-irradiação. Os animais foram tratados previamente com drogas sialogogas isoladas ou em associação antes da irradiação local com dose única de 15 Gy de radiação X. A irradiação resultou num maior atraso para o início da salivação e diminuição do fluxo salivar tanto na parótida quanto na submandibular e sublingual. Os grupos irradiados e tratados previamente com isoproterenol e metacolina associada a fenilefrina, e apenas com fenilefrina apresentaram uma menor redução do fluxo salivar na glândula parótida, respectivamente em tempos precoces e tardios, quando comparado com o grupo apenas irradiado. Para a submandibular não houve alteração significativa precoce para a taxa do fluxo salivar após o tratamento prévio com os sialogogos. Nos tempos tardios a taxa de fluxo foi significativamente menos reduzida após o tratamento prévio à irradiação com fenilefrina e metacolina. Os autores puderam concluir que o tratamento com fenilefrina e em maior extensão metacolina mais fenilefrina, previamente à irradiação, protegeu ambas as glândulas parótida e submandibular do dano tardio radioinduzido, porém tal efeito não estava atribuído à prévia degranulação das células secretoras, e sim devido à ativação de mensageiros relacionados aos receptores destas drogas.

Em 1998a, Nagler *et al.*, avaliaram a taxa de fluxo salivar individual da parótida e submandibular aos 3, 6, 9 e 12 meses após doses únicas de radiação 2,5; 5; 7,5; 10 e 15 Gy de radiação X. Aos três meses houve uma redução significativa no fluxo salivar da parótida para doses iguais ou acima de 5 Gy. No período compreendido entre 6 e 9 meses também houve alteração, porém aos 12 meses todos os grupos mostraram reduções significativas na salivação da

glândula parótida, incluindo uma redução média aproximada de 40% com uma dose única de 2,5 Gy, enquanto que para o grupo de 10 Gy esta média de redução foi de 80%. Para a submandibular o padrão dos efeitos da radiação foi similar, sendo que aos 12 meses a redução em média da taxa de fluxo variou de aproximadamente 40% para as doses de 2,5 Gy a 75% para as doses de 10Gy. Foi demonstrado claramente que quando avaliadas tardiamente (3-12 meses) ambas as glândulas salivares maiores apresentaram dano funcional e estrutural dose-dependente similar.

Nagler, em 2001, estudou durante um ano os efeitos prolongados da irradiação de cabeça e pescoço em ratos. Para isto os animais foram irradiados com uma dose única de 2,5; 5; 7,5; 10 e 15 Gy de radiação X, sendo realizada avaliação histopatológica e investigação dos órgãos aos 2, 6 e 9 meses pós-irradiação. Os resultados nos três primeiros meses demonstraram uma redução dose-dependente no ganho de peso corporal nos animais 2,5-15Gy, acompanhados por mucosite oral, dermatites na pele, úlceras na língua, definhamento e morte de 40% dos animais irradiados com 15 Gy. Após esta fase inicial houve recuperação dos animais. A atrofia tanto na glândula parótida quanto na submandibular foi encontrada 6 meses após a irradiação. O autor concluiu portanto que o efeito da radiação é dose-dependente e é manifestado por uma deterioração crônica e prolongada, eventualmente resultando na morte do animal.

Coopes *et al.*, em 2002, compararam a radiosensibilidade das glândulas parótida e submandibular de ratos após diferentes esquemas de tratamento radioterápico. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle; irradiado com dose única de 15Gy; irradiado com dose convencional fracionada equivalente, totalizando uma dose de 32 Gy em 16 frações de 2Gy/dia, 5 vezes por semana; irradiado com dose de radiação fracionada de 32Gy em 16 frações de 2Gy, duas vezes por dia. Foram medidas a taxa de fluxo salivar, secreção de amilase salivar e histomorfologia das glândulas previamente e 1, 3, 6, 10, 22, 30,

38, 60, 120, 180 e 240 dias após a irradiação. Foi possível observar que após uma dose única de radiação, as glândulas parótida e submandibular apresentaram comportamento muito semelhante com redução do fluxo salivar, redução do peso glandular e do número de células acinares. Após o fracionamento da dose, a glândula submandibular se mostrou significativamente mais sensível do que a parótida, não sendo observadas diferenças entre os esquemas de fracionamento. Diante dos resultados, os autores concluíram que a glândula submandibular é mais sensível quando avaliada tardiamente após o fracionamento da dose e isto pode ser devido ao fato de que esta glândula perde a capacidade de gerar células acinares a partir dos ductos intercalares.

1.2 Hipóteses de Radiossensibilidade das Glândulas Salivares

Para explicar a maior radiossensibilidade da glândula parótida, Abok *et al.*, em 1984, estudando o dano radioinduzido às células secretoras das glândulas submandibulares de ratos submetidos a uma dose de 50 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço, concluíram que metais pesados como o zinco, o manganês e o ferro são encontrados dentro dos componentes granulares de secreção das células serosas, estes promovem a indução da peroxidação lipídica sendo liberados no interior do citoplasma, potencializando o dano e a conseqüente autólise e morte celular.

Em virtude da hipótese da radiossensibilidade das glândulas parótidas estar relacionada à presença dos grânulos de secreção, Peter *et al.*, em 1995, se propuseram a elucidar essa questão, avaliando simultaneamente o efeito da degranulação induzida pelo isoproterenol nas células acinares das glândulas salivares de ratos, usando os parâmetros de aberrações nucleares e lise celular. Foram estudados 4 grupos: controle, controle tratado com isoproterenol, irradiado

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

Nagler *et al.*, 1997b, estudaram o papel dos íons metálicos ferro e cobre no dano radioinduzido e avaliaram a possibilidade de alguma proteção às glândulas salivares parótida e submandibular de ratos. Foram utilizados 4 grupos: controle, grupo que recebeu injeção de salina, grupo que recebeu injeção de salina+pilocarpina e grupo que recebeu injeção de pilocarpina+ciclotidina administradas, intraperitonealmente, 90 minutos antes da irradiação de 15 Gy de radiação X na região de cabeça e pescoço. Foi possível notar uma acentuada perda da função em ambas as glândulas salivares. A ciclotidina é um potente agente degranulador e conferiu 90% de proteção, enquanto que a pilocarpina resultou em apenas 13% de proteção às glândulas parótidas irradiadas. Na submandibular não houve proteção contra a perda de função salivar. A composição da saliva da parótida no grupo pilocarpina+ciclotidina estava acentuadamente rica em ferro, cobre, manganês e proteína, mas na submandibular nenhuma diferença foi encontrada. Os autores concluíram portanto, que a ciclotidina induz degranulação na parótida, mas não na submandibular, sendo bem provável que estes íons metálicos presentes na saliva estejam associados com a mobilização de grânulos de secreção das células

serosas, promovendo reações de radicais livres que estão envolvidos no processo do dano tecidual.

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

Nagler (2002) sugere que o mecanismo do dano radioinduzido e a maior sensibilidade da glândula parótida está relacionada aos íons metálicos de transição, como o ferro e o cobre. Estes íons acentuam o efeito letal que a radiação exerce no DNA, causando dano sub letal, que se manifesta e se torna letal tardiamente na fase reprodutiva. Os agentes de injúria são os íons metálicos, tais como o ferro e o cobre, sendo bastante provável que a morte celular reprodutiva ocorra quando estes íons redox-ativos não estejam seqüestrados dentro dos grânulos, mas sim localizados em íntima proximidade ao DNA.

1.3 Vitamina E

1.3.1 Propriedades e Mecanismo de ação

Packer *et al.*, em 1979, afirmaram que a função essencial da vitamina E é capturar os radicais peróxidos e quebrar a reação em cadeia da peroxidação lipídica. Segundo os autores o alfa tocoferol é o mais potente anti-oxidante dentre os tocoferóis, reagindo mais rapidamente com os radicais peróxidos do que os outros derivados ou ácidos graxos polinsaturados, formando um radical “alfa-tocoferoxyl”. Logo, esta reação em cadeia tende a terminar ao invés de se propagar. Subseqüentemente, o alfa tocoferol é regenerado pela ação do ácido ascórbico e os radicais podem ser completamente oxidados.

De acordo com Kayden & Traber, 1993, a vitamina E ocorre na natureza em oito diferentes formas; alfa, beta, gama e delta tocoferol e o alfa, beta, gama e delta tocotrienol. Estas diferem entre si quanto as suas atividades biológicas e antioxidantes. Dentre estes compostos o alfa tocoferol é aquele que apresenta a maior atividade biológica.

Segundo Penildon Silva, 1998, a vitamina E é absorvida no intestino delgado, sendo esta absorção favorecida pela presença de gorduras e bile. Após a absorção, chega à corrente sanguínea pela via linfática, estando presente no plasma associada à sua fração lipídica. Quando é administrada pela via oral, 50 a 80% da vitamina ingerida é absorvida.

Goodman & Gilman, em 2003, afirmaram que a vitamina E compreende oito tocoferóis, sendo o α tocoferol o mais importante, já que compreende aproximadamente 90% dos tocoferóis em tecidos animais e possui a maior atividade biológica. Sua principal via de absorção é o trato gastrintestinal,

chegando à corrente sanguínea através da linfa. Está distribuída por todos os tecidos, e os depósitos teciduais fornecem fonte de vitamina por longo tempo, como já foi demonstrado em animais mantidos em dieta deficiente. Atuando como antioxidante, a vitamina E impede a oxidação de constituintes celulares essenciais ou anula a formação de produtos de oxidação tóxicos, tais como os produtos da peroxidação dos ácidos graxos não saturados.

1.3.2 Ação radioprotetora da vitamina E

Sarma & Kesavan, 1993, estudaram o efeito protetor de vitaminas C e E, administradas oralmente, em relação ao dano nos cromossomos da medula óssea de ratos irradiados no corpo todo com 1 Gy de radiação γ . O dano cromossomal foi quantificado a partir da frequência de aparecimento de micronúcleos nos eritrócitos. Estes surgem a partir de um fragmento de cromossomo acêntrico ou de cromossomos que não foram incorporados dentro dos núcleos das células filhas durante a mitose. Observou-se um aumento substancial na frequência de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos nos grupos controle. O ácido ascórbico e a vitamina E quando administradas 2 h antes ou imediatamente após a irradiação reduziu significativamente o aparecimento de micronúcleos assim como o aparecimento de metáfases danificadas. Os autores observaram que o alfa tocoferol permitiu maior radioproteção do que o ácido ascórbico, pois protege a membrana lipossomal contra a peroxidação lipídica.

Felemovicius *et al.*, em 1995, afirmaram que os efeitos da radiação ionizante são mediados principalmente pelos radicais livres oxigênicos, os quais são gerados pela radiólise da água. Estes oxidantes altamente reativos removem os átomos de hidrogênio dos ácidos graxos, causando peroxidação lipídica com alterações resultantes na permeabilidade da membrana e conseqüentemente morte celular. A partir daí os autores avaliaram a capacidade da vitamina E,

administrada por via intraluminal, em proteger o intestino delgado de ratos após irradiação local com 11 Gy de radiação X, além de comparar a ação do acetato α tocoferol dissolvido em gordura em relação ao fosfato α tocoferol que é dissolvido em água. Cinco dias após a irradiação, os animais foram sacrificados e foi constatada proteção com a administração intraluminal de acetato ou fosfato α tocoferol, não sendo diferente a proteção entre os dois compostos. Nos animais que receberam dieta rica em vitamina E foi observada preservação significativa da cripta quando comparados com os animais do grupo controle. Os autores concluíram, portanto, que a administração de vitamina E por via oral atua como radioprotetor podendo solucionar problemas encontrados previamente no desenvolvimento de um regime farmacológico prático e altas doses desse componente não apresentam efeitos adversos agudos ou crônicos.

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

saliva dos ratos irradiados, sendo menos significativa nos animais com dieta suplementada. As concentrações de cálcio, sódio, potássio, proteína total e a atividade de amilase estavam significativamente acentuadas nos ratos irradiados e alimentados com dieta básica, sendo este aumento menos pronunciado nos ratos com dieta suplementada. Os dados sugerem que a suplementação com α -tocoferol e β caroteno protege parcialmente as glândulas salivares de ratos dos efeitos adversos da radiação. O fluxo foi parcialmente preservado e os sinais de reações inflamatórias, avaliados pela secreção de albumina, estavam menos pronunciados nos animais alimentados com dieta suplementada.

Konopacka *et al.*, em 1998, estudaram o possível papel das vitaminas antioxidantes (β caroteno, C e E) isoladas ou em associação na modulação do dano ao DNA induzido pela irradiação local com 2 Gy de radiação gama. As doses dos compostos utilizados variaram de 0,1 a 0,2 ml, e foram administradas oralmente durante cinco dias consecutivos antes e imediatamente após a irradiação. A avaliação foi realizada dois dias após a irradiação através da observação da frequência de micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea e 4, 8, 10, 13 e 16 dias após para as células esfoliadas da bexiga. Nesse experimento, esta avaliação foi empregada como uma medida do dano genético radioinduzido por ser considerada como um marcador biológico da quebra cromossômica e do dano ao aparato mitótico. Foram observados em ambos os tecidos avaliados uma diminuição no número de micronúcleos com o aumento da dose de β caroteno, havendo uma proteção máxima com 12 mg/kg administrada 5 dias antes da irradiação. A ação protetora máxima da vitamina C foi observada tanto nos eritrócitos da medula óssea quanto nas células esfoliadas da bexiga com uma dose de 50-100 mg/kg/dia. Uma diminuição estatisticamente significativa no número de micronúcleos foi observada para uma dose mínima de 100 mg/kg por dia de vitamina E administrada oralmente antes da irradiação. As células esfoliadas da bexiga foram protegidas pela vitamina E em todas as doses testadas (50, 100 e 200), mas uma diferença significativa foi observada a 100 e 200 mg /kg.

No grupo tratado com a mistura de vitaminas C, E e β caroteno foi observado maior efeito protetor para ambos os grupos celulares estudados. Os resultados desse estudo indicaram que a administração oral de vitaminas C, E e β -caroteno pode exercer um efeito protetor contra o dano genético induzido, in vivo, pela radiação gama.

Konopacka & Rzeszowska-Wolny, em 2001, avaliaram o efeito protetor das vitaminas antioxidantes C, E e beta caroteno no dano ao DNA em culturas de linfócitos humanos após dose de radiação gama de 2 Gy. As culturas celulares foram expostas a doses crescentes destas vitaminas, as quais foram adicionadas antes e após a irradiação. O dano ao DNA foi avaliado através do teste de micronúcleos realizado 72 horas após a irradiação. Foi possível observar que a vitamina E presente a 5-10 $\mu\text{g/ml}$ durante a irradiação diminuiu significativamente o número de micronúcleos quando comparado com o grupo controle e que doses abaixo de 2 $\mu\text{g/ml}$ não influenciavam no nível de dano cromossomal. Quando adicionadas imediatamente após a irradiação, só houve proteção para as duas maiores concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$. O β -caroteno diminuiu o número de micronúcleos radioinduzidos nas concentrações testadas de 1 a 5 $\mu\text{g/ml}$ quando adicionado antes e após a irradiação, sendo que nesta última foi observado maior efeito protetor. Foi observado efeito protetor nas culturas irradiadas na presença de vitamina C (1 $\mu\text{g/ml}$) e quando adicionada após a irradiação houve proteção nas concentrações testadas de 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. Os dados sugerem que o efeito protetor das vitaminas testadas nesse estudo depende de suas concentrações assim como do tempo e sequência de aplicação.

Manzi *et al.*, em 2003, estudaram o efeito radioprotetor da vitamina E no processo de reparação tecidual em ratos. Os animais foram divididos em cinco grupos: controle, no qual os animais sofreram apenas o procedimento cirúrgico; vitamina E, caracterizado por animais que sofreram o procedimento cirúrgico um

dia após a administração intraperitoneal de três doses, com intervalo de 48 horas, de acetato de dl-alfa-tocoferil (vitamina E); irradiado, constituído por animais que foram localmente irradiados com dose de 6Gy de radiação de elétrons, três dias após a realização da ferida cirúrgica; vitamina E/irradiado, grupo no qual os animais sofreram os mesmos procedimentos do grupo vitamina E e irradiado; óleo de oliva/irradiado, caracterizado por animais que sofreram o procedimento cirúrgico um dia após a administração intraperitoneal de três doses, com intervalo de 48 horas, de óleo de oliva. A avaliação foi realizada aos 4, 7, 14 e 21 dias após a confecção da ferida. Foi possível observar que não houve diferença morfológica no processo de reparação tecidual entre o grupo vitamina E/ irradiado e o grupo controle em todos os tempos avaliados. Em relação ao grupo irradiado e óleo de oliva/irradiado, o grupo vitamina E/irradiado apresentou um processo de reparação tecidual mais adiantado. Portanto, os autores concluíram que a vitamina E atuou junto ao processo de reparação tecidual como um eficiente radioprotetor.

2. PROPOSIÇÃO

Tivemos como objetivo neste trabalho avaliar o efeito radioprotetor da vitamina E na função salivar de ratos irradiados, bem como analisar a concentração de proteína total na saliva.

Evaluation of Radioprotective effect of Vitamin E in Salivary Dysfunction in Irradiated Rats

Flávia Maria de Moraes Ramos, DDS^{1,*}, Maria Luiza dos Anjos Pontual, DDS¹, Solange Maria de Almeida, DDS, PhD¹, Frab Norberto Bóscolo, DDS, PhD¹, Cinthia Pereira Machado Tabchoury, PhD², Pedro Duarte Novaes, PhD³

¹ Oral Radiology, School of Dentistry of Piracicaba/UNICAMP, Piracicaba, São Paulo, Brazil

² Biochemistry, School of Dentistry of Piracicaba/UNICAMP

³ Oral Histology, School of Dentistry of Piracicaba/UNICAMP

Address for correspondence:

Flávia Maria de Moraes Ramos

School of Dentistry of Piracicaba- University of Campinas- Oral Radiology

Av Limeira, 901, Cx. Postal 52- CEP: 13414-018

Piracicaba-SP-Brazil

Telephone: +55-19-3412-5327

Fax: +55-19-3412-5218

E-mail: flaviamarca@fop.unicamp.br

Running title: Radioprotective effects of Vitamin E

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the radioprotective effect of vitamin E in salivary gland function, as well as analyze the total protein concentration. For this purpose 90 male rats were used and randomly divided into 5 experimental groups: control (I), in which animals received olive oil solution; irradiated olive oil (II), in which animals were irradiated with a single exposure dose of 15 Gy of gamma rays to the head and neck region; irradiated (III), in which animals were only irradiated with a single exposure dose of 15 Gy of gamma rays; vitamin E (IV), in which animals received α tocopherol acetate solution but were not irradiated; irradiated vitamin E (V), in which animals received α tocopherol acetate solution before irradiation with a single exposure dose of 15 Gy gamma rays. The animals were sacrificed 4, 8 hours and 30 days after the irradiation procedure. No differences were observed in salivary volumes between the groups at 4 and 8 hours. At 30 days, the salivary volume in the animals pertaining to the irradiated olive oil group was significantly reduced in relation to the control group. The irradiated group presented significantly diminished salivary volume. In the salivary composition, no significant differences were observed in the total protein content between the groups studied. It was concluded that radiation had no effect on the total protein content and that vitamin E protected the salivary function 30 days after irradiation. Thus, vitamin E can be considered as a potential radioprotective substance.

Key Words: ionizing radiation, salivary glands, radiation-protective agents, vitamin E.

INTRODUCTION

Irradiation delivered to the head and neck is a common treatment for malignancies and the radiation field frequently includes the salivary glands. Exposure of the major salivary glands often results in severe alterations in structure and function.^{1,2} Patients who receive radiation in cancer therapy may complain about numerous side effects including xerostomia, dysphagia, taste changes, high dental caries risk, difficulty in swallowing and speaking, which may impair the patient's quality of life.³

Saliva is essential for maintaining the oral cavity healthy.⁴ Although salivary glands should be considered to be radio-resistant, due to highly differentiated cells,⁵ when they are exposed to ionizing radiation, their function is rapidly affected.⁶ It is accepted that the most affected and sensitive glands are the parotids, while the submandibular and sublingual are somewhat more resistant.^{2,7-9} Serous cells are considered to be more radiosensitive than mucous cells, because serous secretory granules are rich in transition metals such as Zn^{++} , Fe^{++} and Mn^{++} , which may leak into the cytoplasm, causing autolysis and cell death.⁸ At later stages changes in salivary gland and reduction in salivary function was observed for both parotid and submandibular glands within 3 months to 1 year.⁹

The effects of ionizing radiation are mediated by the formation of free radicals, which are highly reactive, removing hydrogen atoms from fatty acids, causing lipid peroxidation and consequently cell death.¹⁰ Vitamin E (α tocopherol) is a natural component of cell membranes and is the strongest antioxidant of the

tocopherols; it reacts quickly with peroxy radicals and forms a α tocopheroxyl radical, which interrupts the free radical chain reaction.¹¹ A wide range of radioprotective effects associated with Vitamin E have been demonstrated, such as preservation of the small bowel crypt, increase in the rate of the DNA repair process¹² and reduction in the number of micronuclei in human lymphocytes *in vitro*.¹³ In salivary glands, little is known about the radioprotective effect of vitamin E.¹⁴ Reduction of the adverse effects of radiotherapy, such as decrease in salivary function, will improve the quality of life for surviving patients. The aim of this study was to evaluate whether supplementation with α tocopherol could diminish the radiation-induced damage to major salivary glands, through salivary secretion measurements, as well as to analyze the concentrations of total protein in saliva after irradiation procedures.

MATERIAL AND METHODS

Male Wistar rats between 8 and 10 weeks old were used. They were kept in polycarbonate cages under an alternating 12-h light dark cycle. Animals were maintained on laboratory chow and water *ad libitum*. The animals were randomly divided into five groups, each containing 6 animals: I-control (C) which received three doses of 4 ml/kg of olive oil orally given 24, 48 and 72 hours before sham-irradiation; II-irradiated oil (IO) which received three doses of olive oil (4 ml/kg) given orally 24, 48 and 72 hours before the irradiation; III-Irradiated (I) in this group the animals were only irradiated; IV-Vitamin E group (VE), where the animals

received three doses of vitamin E (360mg/kg) given orally 24, 48 and 72 hours before sham-irradiation procedure and V- Vitamin E Irradiated Group (VE I), in this group the rats received three doses of vitamin E (360 mg/kg) given orally 24, 48 and 72 hours before the irradiation procedure. Thirty minutes before the actual and sham irradiations, the animals were weighed and anesthetized by an intramuscular injection of ketamin chlorhydrate (0.1 mg/kg) and xylazin (0.05mg/kg), and then placed on the table with a 3mm lead to protect the body, so that only the head and neck regions were exposed. The irradiation field corresponded to 30 x 30 cm. The animals were irradiated with ^{60}Co with a single acute exposure of 15 Gy delivered by an Alcion CGR II (Siemens) with an output of 84 cGy/min at 80 cm and operating with energy of 1.25 MeV. Control animals (I and IV) were anesthetized but not irradiated (sham irradiated). All irradiation was done between 9:00 a.m. and 11:00 a.m. (Table I).

Stimulated whole saliva was collected 4, 8 hours and 30 days after irradiation, in order to evaluate the early and late effects of radiation on salivary secretion after irradiation procedures. Prior to this procedure, the animals were weighed and anesthetized with 30mg/kg pentobarbital (ip). Salivary secretion was stimulated with pilocarpina HCl (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). As soon as flow was noted, the whole saliva was collected for 30 minutes into pre-weighed tubes. The volume of saliva secreted was estimated by weight, assuming that the specific gravity of saliva is 1.0 g/cm^3 . The period between injection of pilocarpine

and the examination of the first drop of saliva in the pre-weighed cups was defined as the lag phase.¹⁵

The sialochemical analyses were performed for total protein in the saliva samples. All samples were kept on ice until analyses. Protein concentration in saliva was determined by the Lowry method.¹⁶

For statistical analysis, data were initially evaluated using ANOVA. Significant differences were resolved with the Tukey test, with significant p-value < 0.05.

RESULTS

No signs of oral mucositis were observed, although the mucosa showed a slight hyperemia in some irradiated animals. All animals gained weight after irradiation, but the weight increase rate was lower in irradiated rats compared to the control and non-irradiated rats. The lag phase duration was quite similar between the 4 and 8 hour groups and markedly increased at 30 days after irradiation in groups II and III. At this time, the irradiated group pre treated with vitamin E showed the shortest lag phase.

In the periods of 4 and 8 hours after stimulated salivary secretion, a reduction was observed in the volume of saliva in the irradiated group (III) when compared to the sham-irradiated control (I), but there were no significant differences between the groups at these times. A slight but not statistically significant increase in salivary secretion could be observed at 8 hours, between the

irradiated groups that received treatment with olive oil (II) and vitamin E (V). There were no significant differences in the volume between all the groups at 4 and 8 hours after irradiation (Table 2).

At 30 days, the salivary secretion in the un-treated irradiated group (III) was significantly reduced when compared to the control (I), V.E (IV) and V.E Irradiated group (V). These groups presented similar salivary volume. Group II pre-treated with olive oil presented lower values than the control (I), Vitamin E (IV) and Irradiated pre-treated with vitamin E (V) groups, being significant only for the control group (I). This group II pre-treated with olive oil, showed a saliva volume similar to that of the irradiated group (III). At this time, just the only-irradiated group (III) presented the most accentuated reduction. The data was able to demonstrate that salivary secretion was preserved by treatment with vitamin E prior to irradiation (Figure). In saliva composition there were no significant differences in total protein (table 3) measurements between the groups studied. The constituent measured showed significant reduction only at 4 hours for all the groups examined, after that the values increased and became stable.

DISCUSSION

In this research we used the rat model, because of its convenience and because the fluid and protein secretion mechanism, and because of the rapid reduction in salivary flow after irradiation is quite similar with the human salivary glands.¹⁷

The short and later term effects of irradiation on the salivary glands are observed in a dose dependent manner after exposure to ionizing radiation. Because salivary glands are frequently included in the radiotherapy field for the treatment of head and neck malignancies, their function is rapidly impaired.^{1,18} In this study, an acute and relatively high dose of 15 Gy of gamma rays was used to test the properties of vitamin E as a radioprotector, as it presents clinical relevance, since it was previously demonstrated that a saturation of the irradiation effects, at a dose of about 15 Gy,¹⁹ starts to induce salivary gland dysfunction.

As can be seen in the English language literature, numerous researches have examined salivary gland function after irradiation and the different results found are due to the number of different techniques and experimental procedures used. The reduction in salivary function can be observed early after an acute dose to the head and neck region. Functional studies have demonstrated early alterations in function as early as 0.5 and 1 hour later, being significantly different only at 24 hours after irradiation.¹⁸ Similarly, in the present study, a reduction, not significant however, was observed in the volume of whole saliva at 4 and 8 hours between the irradiated (III) and control sham-irradiated (I) group. However, at 30 days after ionizing radiation exposure there was a marked reduction in salivary secretion in the groups pre-treated with olive oil and non-treated irradiated groups (II and III), when compared with control (I) and vitamin E (IV) sham-irradiated groups.

After 2 weeks of the irradiation procedure, the parotid flow remains reduced after 11 days, but similar alterations are also noted in the non-irradiated group with a diet similar to that of the irradiated group, concluding that these alterations are not directly related to the radiation damage, the effect of restriction of food and water intake being apparent, and causing the oropharyngeal syndrome. In contrast, submandibular/sublingual flow rates are basically unaffected by 15 Gy or diet restrictions during the period studied,⁶ confirming that these glands are relatively radioresistant.^{7, 18} On the other hand, a reduction in both parotid and submandibular salivary function was observed 40 days after a dose of 15 Gy.²⁰ Furthermore, when evaluated over a 3-12 month period, both parotid and submandibular salivary glands, showed similar reduction in function, with doses ranges from 2.5 to 15 Gy, but the dramatic effects were observed earlier at 3 months for both glands, and persisted up to 12 months after 15 Gy of X irradiation to the head and neck.⁹ Thus, it seems probable that when evaluated at later times, both parotid and submandibular glands present a similar structural and functional damage. The long term damage could be related with the involvement of the DNA targets in salivary glands, which result in a reproductive cell death.^{5,17} In this study alpha tocopherol was used, because of its higher biological activity and anti-oxidative properties.

A number of antioxidant agents have been used in attempting to minimize the side effects caused by radiotherapy in the head and neck region, mainly the damage done to salivary glands,^{7,21-23} and among these agents is vitamin E. The

exact metabolism of vitamin E is unknown. The main function is to react with peroxy radicals and form an alpha tocopheroxyl radical, interrupting the lipid peroxidation chain reaction.¹¹ Its antioxidant action is to protect the cellular membrane from oxidative damage by free radicals.¹¹ A significant reduction in the frequency of micronuclei formation in bone marrow cells of mice exposed to gamma rays was observed by Sarma and Kesavan²⁴ when these animals received vitamin E orally prior to radiotherapy. Furthermore, Konopacka *et al*¹² demonstrated a great reduce in radiation induced genetic damage by oral administration of vitamins C, E and beta carotene immediately after radiation exposure, suggesting a DNA repair mechanism in irradiated lymphocytes. A radioprotective effect provided by vitamin E administered intralumenally was noted by Felemovicius *et al*¹⁰, who observed significant preservation of the small bowel crypt. The authors suggest that the use of oral vitamin E as a radioprotective drug could solve some of the problems encountered earlier in the development of a practical and safe pharmacologic regimen. The alterations in salivary secretion and saliva composition caused by irradiation are less severe if vitamins, such as α tocopherol and β carotene, are administered daily in the rats' diet shortly before and during irradiation.¹⁴ In the present study, similar protection was observed, because the maximum salivary reduction in the irradiated groups (II and III) was achieved 30 days after irradiation and the group pre-treated with vitamin E (V) showed significantly less pronounced damage. Thus, a protection given by this

antioxidant vitamin may be advocated. Supraphysiological doses of vitamin E have been proposed as a potential radioprotector; high doses of this antioxidant have no adverse side effects.¹⁰ In the present research, 360mg/kg given orally 24, 48 and 72 hours before irradiation procedure was administered, and no alterations or side effects were observed in the rats studied.

The constituent measured, such as total protein, showed significant reduction only at 4 hours for all the groups examined, there being no significant differences between irradiated and non-irradiated groups; after that, the values increased and became stable. Protein concentration in whole rat saliva is about 13 to 18 mg, four to five times that of whole human saliva.²⁵ No significant differences in the total protein measured in whole saliva were found between irradiated and control animals for all the times evaluated. This is similar to Nagler *et al*¹⁸, who previously reported similar results of total protein content in both submandibular and parotid flow for 24 hours after irradiation. Furthermore, Nagler *et al*² showed that there was no difference in the mean total protein concentration after 2 months of irradiation between control, irradiated and Zn-DFO pre-treated animals. Differently, Nagler *et al*²⁶ making qualitative and quantitative analysis of the parotid salivary protein composition after doses ranging from 2.5 to 15 Gy, showed no qualitative changes but significant quantitative reductions at 3 days, 3 and 9 months. For the submandibular glands there is no alteration at any dose or at any of the times studied. These differences in total protein values may be explained by the different methods and techniques used in each experiment. Mossman *et al*²⁷

using three different methods, such as Lowry, Waddell and Warburg and Christian to estimate total protein in parotid salivary secretion in humans shows a 60% decrease in total protein secretion after 1 week. This data suggest that the radiation treatment did not affect the parotid salivary constituents equally. Thus, each of the methods is sensitive to a different type of protein.

The severe oral mucositis, reduction in food and water intake and mastication presented in animals that developed the oropharyngeal syndrome,^{6,28} could be associated with a diminished total protein content in the parotid gland and salivary gland hypofunction.^{6,29} In the present study, the irradiated animals did not present signs of mucositis, so no reduction in mastication was observed, which is consistent with the body weight. Although this rate of increase was lower compared to the controls, the irradiated animals gained weight during the experiment. Thus these data may explain the similarity of the protein content between irradiated and non-irradiated animals.

In conclusion, radiation did not have any effect on the total protein content of saliva. Furthermore, a significant protection of the salivary flow could be noted 30 days after irradiation in the group pre treated with vitamin E and irradiated. Based on these results, the vitamin E seems to have an important radioprotective effect on salivary function, further investigations being necessary in the future with regard to its application in humans.

REFERENCES

1. Dreizen S, Brown LR, Handler S, Levy BM. Radiation-induced xerostomia in cancer patients. Effect on salivary and serum electrolytes. *Cancer* 1976; **38**: 273-278.
2. Nagler R, Marmary Y, Golan E, Chevion M. Novel protection strategy against X ray induced damage to salivary glands. *Radiat Res* 1998; **149**: 271-276.
3. Franzén L, Funegard U, Ericson T, Henriksson. Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck. *Eur J Cancer* 1992; **28**: 457-462.
4. Takagi K, Yamaguchi K, Sakurai T, Asari T, Hashimoto K, Terakawa S. Secretion of saliva in X irradiated rat submandibular glands. *Radiat Res* 2003; **159**: 351-360.
5. Coopes RP, Zeilstra LJW, Vissink A, Konings AWT. Sialogogue-related radioprotection of salivary gland function: the degranulation concept revisited. *Radiat Res* 1997; **148**: 240-247.
6. Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. A 2 week pair-fed study of early X irradiation effects on rat major salivary gland function. *Arch Oral Biol* 1996; **41**: 713-717.
7. Sodicoff M, Conger AD, Pratt NE, Trepper P. Radioprotection by WR-2721 against long-term chronic damage to the rat parotid gland. *Radiat Res* 1978; **76**: 172-179.
8. Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virch Arch B Cell Pathol* 1984; **45**: 443-460.

9. Nagler RM, Baum BJ, Miller G, Fox PC. Long-term salivary effects of single dose head and neck irradiation in the rat. *Arch Oral Biol* 1998; **43**: 297-303.
10. Felemovicius I, Bonsack ME, Baptista ML, Delaney JP. Intestinal radioprotection by vitamin E (Alpha-tocopherol). *Ann Surg* 1995; **222**: 504-510.
11. Kayden HJ, Traber MG. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 1993; **34**: 343-358.
12. Konopacka M, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. Modifying effect of vitamins C, E and beta carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutat Res* 1998; 417: 85-94.
13. Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J. Antioxidants vitamins C, E and beta carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 2001; **491**: 1-7.
14. Funegard U, Johansson I, Malmer B, Henriksson R, Ericson T. Can α tocopherol and β carotene supplementation reduce adverse radiation effects on salivary glands? *Eur J Cancer* 1995; **31A**: 2347-2353.
15. Vissink A, Konings AWT, Ligeon EE, s-Gravenmade EJ. Irradiation-induced changes in secretion and composition of rat saliva. *J Biol Buccale* 1990; **18**: 3-8.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; **193**: 265-75.
17. Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis* 2002; **8**: 141-146.

18. Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Acute effects of X irradiation on the function of rat salivary glands. *Radiat Res* 1993; **136**: 42-47.
19. Vissink A, s-Gravenmade EJ, Ligeon EE, Konings AWT. A functional and chemical study of radiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands. *Radiat Res* 1990; **124**: 259-265.
20. Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Effects of X irradiation on the function of rat salivary glands at 3 and 40 days. *Radiat Res* 1993; **136**: 392-396.
21. Sodicoff M, Conger AD, Pratt NE, Sinesi M, Trepper P. Chemoradioprotection of the rat parotid gland by combined use of WR-2721 and Ro-07-0582. *Radiat Res* 1979; **80**: 348-53.
22. Sodicoff M, Conger AD. Radioprotection of the rat parotid gland by WR-2721 and isoproterenol and its modification by propanolol. *Radiat Res* 1983; **94**: 97-104.
23. Nagler RM, Reznick AZ, Slavin S, Nagler A. Partial protection of rat parotid glands from irradiation-induced hyposalivation by manganese superoxide dismutase. *Arch Oral Biol*. 2000; **45**: 741-7.
24. Sarma L, Kesavan PC. Protective effect of vitamins C and E against γ -ray-induced chromosomal damage in mouse. *Int J Radiat Biol* 1993; **63**: 759-764.
25. Sweeney EA, Shaw JH, Childs EL, Weisberger D. Studies on the protein composition of rodent saliva-I. *Arch Oral Biol* 1962; **7**: 621-631.
26. Nagler RM, Marmary Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M. Irradiation induced damage to the salivary glands: the role of redox active iron and copper. *Radiat Res* 1997; **147**: 468-475.

27. Mossman KL, Shatzman AR, Chencharick JD. Effects of radiotherapy on human parotid saliva. *Radiat Res* 1981; **88**: 403-412.
28. Sodicoff M, Pratt NE, Trepper P, Sholley MM, Hoffenberg S. Effects of X irradiation and the resultant inanition on amylase content of the rat parotid gland. *Arch Oral Biol* 1977; **22**: 261-267.
29. Scott BL, Berry MR, Gunn dl, Woods K. The effects of a liquid diet on initial and sustained stimulated parotid salivary secretion and on parotid stucture in the rat. *Arch Oral Biol*. 1990; **35**: 509-14.

Table 1- Summary of the different experimental groups used in this study

Groups	No of rats	Irradiation dose	Treatment
Control-Olive Oil (I)	6	No	4 ml/kg olive oil
Irradiated O Oil (II)	6	15 Gy γ rays	4 ml/kg olive oil
Irradiated (III)	6	15 Gy γ rays	No
Vitamin E (IV)	6	No	360mg/kg α tocopherol acetate
Irradiated Vitamin E (V)	6	15 Gy γ rays	360mg/kg α tocopherol acetate

Table 2- Mean salivary volume stimulated by pilocarpine, in milliliters (ml), of the different groups of rats (n=6) according to evaluated times*

Group	Time		
	4 h	8 h	30d
Control-Olive Oil (I)	1.54 (0.38) a A	1.04 (0.38) a A	1.06 (0.38) a A
Irradiated O Oil (II)	1.22 (0.30) a A	1.42 (0.78) a A	0.54 (0.30) bc B
Irradiated (III)	1.34 (0.23) a A	1.00 (0.30) a A	0.31 (0.09) c B
Vitamin E (IV)	1.06 (0.13) a A	1.02 (0.32) a A	0.98 (0.49) ab A
Irradiated Vitamin E (V)	1.18 (0.35) a A	1.19 (0.55) a A	0.73 (0.24) ab A

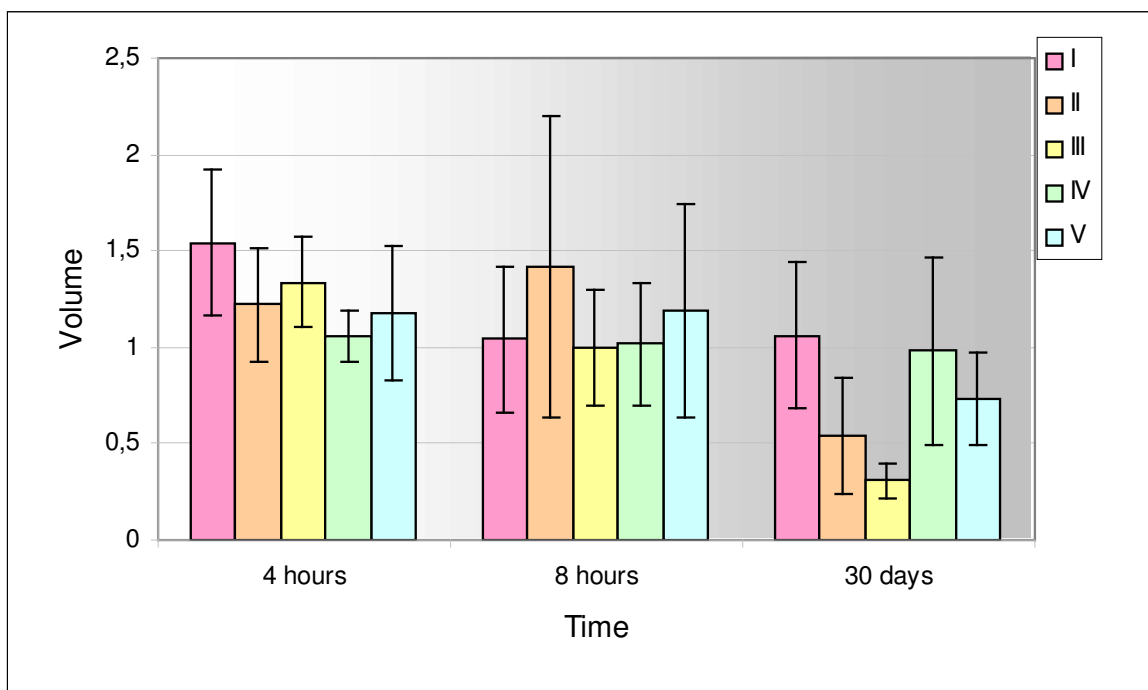
*Means followed by different lower case letters in the column and capital letters in the line differ statistically among them, with significant p-value of 5%, by the Tukey test

Table 3- Mean total salivary protein content stimulated by pilocarpine, in milligrams/milliliters (mg/ml), of the different groups of rats (n=6), according to evaluated times*

Group	Time		
	4 h	8 h	30d
Control- Olive Oil (I)	6.9 (2.33) a B	13.4 (4.01) a A	13.0 (6.04) a A
Irradiated O Oil (II)	5.5 (2.16) a B	10.3 (4.81) a A	8.0 (2.39) a A
Irradiated (III)	5.2 (1.30) a B	11.3 (5.06) a A	11.7 (2.37) a A
Vitamin E (IV)	8.3 (1.27) a B	11.6 (4.07) a A	9.9 (2.87) a A
Irradiated Vitamin E (V)	6.0(2.17) a B	13.8 (7.91) a A	12.6 (7.27) a A

*Means followed by different lower case letters in the column and capital letters in the line differ statistically among them, with significant p-value of 5%, by the Tukey test

Figure



Legend

Figure- The graph shows the mean salivary volume stimulated by pilocarpine of the different groups of rats (I-Control-Olive oil; II-Irradiated Olive Oil; III-Irradiated; IV-Vitamin E; V-Irradiated vitamin E), according to evaluated times.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

a- A vitamina E foi eficiente como radioprotetor na função salivar 30 dias após a irradiação.

b- A concentração de proteína total da saliva não se alterou após a irradiação.

REFERÊNCIAS*

Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virch Arch B Cell Pathol.* 1984; 45: 443-60.

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

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

Felemovicius I, Bonsack ME, Baptista ML, Delaney JP. Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol). *Ann Surg.* 1995; 222(4): 504-10.

Funegard U, Franzén L, Ericson TH, Henriksson R. Parotid saliva composition during and after irradiation of head and neck cancer. *Oral Oncol.* 1994; 30B: 230-33.

Funegard U, Johansson I, Malmer B, Henriksson R, Ericson T. Can α -tocopherol and β -carotene supplementation reduce adverse radiation effects on salivary glands? *Eur J Can.* 1995; 31A (13/14): 2347-53.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

Franzen L, Funegard U, Ericson T, Henriksson R. Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck. *Eur J Cancer*. 1992; 28: 457-62.

Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana do Brasil; 2003.

Kayden HJ, Traber MG. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans. *J Lipid Res*. 1993; 34: 343-58.

Konopacka M, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutat Res*. 1998; 417: 85-94.

Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J. Antioxidant vitamins C, E and β -carotene reduce DNA damage before as well as after γ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*. 2001; 491: 1-7.

Manzi FR, Bóscolo FN, Almeida SM, Tuji FM. Estudo morfológico do efeito radioprotetor da vitamina E (dl-alfa tocoferil) na reparação tecidual em ratos. *Radiol Bras*. 2003; 36(6): 367-71.

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

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

Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Effects of X irradiation on the function of rat salivary glands at 30 and 40 days. *Radiat Res.* 1993b; 136: 392-6.

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

Nagler RM, Nagler A, Laufer D. Sialochemical profile of X irradiated major salivary glands in the rat. *Int J Radiat Biol.* 1997a; 71(4): 441-8.

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

Nagler RM, Baum BJ, Miller G, Fox PC. Long-term salivary effects of single dose head and neck irradiation in the rat. *Arch Oral Biol.* 1998a; 43: 297-303.

Nagler RM, Marmary Y, Golan E, Chevion M. Novel protection strategy against X ray induced damage to salivary glands. *Radiat Res.* 1998b; 149: 271-6.

Nagler RM. Extended-term effects oh head and neck irradiation in a rodent. *Eur J Cancer.* 2001; 37:1938-45.

Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis.* 2002; 8: 141-6.

Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature.* 1979; 278:737-8.

Peter B, Van Waarde MAWH, Vissink A, s-Gravenmade EJ, Konings AWT. The role of secretory granules in radiation induced dysfunction of rat salivary glands. *Radiat Res.* 1995; 141: 176-82

Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of vitamins C and E against γ -ray-induced chromosomal damage in mouse. *Int J Radiat Biol.* 1993; 63(6): 759-64.

Silva P. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

Takagi K, Yamaguchi K, Sakurai T, Asari T, Hashimoto K, Terakawa S. Secretion of saliva in X irradiated rat submandibular glands. *Radiat Res.* 2003; 159: 351-60.

Valdez IH, Atkinson JC, Ship JA, Fox PC. Major salivary gland function in patients with radiation induced xerostomia: flow rates and sialochemistry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993; 25: 41-7.

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

Vissink A, s-Gravenmade EJ, Ligeon EE, Konings AWT. Effects of split dose X irradiation on rat salivary gland function. *Radiat Res.* 1991; 127: 52-7.

ANEXO 1



Figura 1: Frasco de óleo de oliva (à esquerda) e pó de acetato de alfa tocoferol (à direita).



Figura 2: Administração de vitamina E por via enteral



Figura 3: Ratos devidamente posicionados para o procedimento de irradiação da região de cabeça e pescoço



Figura 4: Visão mais detalhada dos ratos posicionados para o procedimento de irradiação da região de cabeça e pescoço



Figura 5: Frasco contendo Pilocarpina HCl (Sigma, Aldrich Co)



Figura 6: Administração via intraperitoneal de solução de pilocarpina



Figura 7: Ratos devidamente posicionados para coleta de saliva

ANEXO 2



Submissions Being Processed for Author Flavia Maria de Moraes Ramos, DDS

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
View Submission	AOB-D-05-00014	Evaluation of Radioprotective effect of Vitamin E in Salivary Dysfunction in Irradiated Rats	10 Jan 2005	Under Review

ANEXO 3



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

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

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **600-1**, sobre "**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DE VITAMINA E EM GLÂNDULA PARÓTIDA DE RATOS IRRADIADOS**" sob a responsabilidade de **Prof.Dr. Pedro Duarte Novaes/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 03 de Outubro de 2003.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **600-1**, entitled "**EFFECTIVENESS OF VITAMIN E AS RADIOPROTETOR IN SALIVARY GLANDS OF IRRADIATED RATS**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 3, 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 03 de Outubro de 2003.

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP