



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

“EFEITO DA FITOTERAPIA SOBRE PARÂMETROS
MORFOLÓGICOS EM ALVÉOLO DE RATOS IRRADIADOS.
ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO.”

Aluna: Karine Keila Cavalcanti

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Ano de conclusão do curso: 2010

A handwritten signature in black ink, appearing to read "F. C. Groppo".

Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



KARINE KEILA CAVALCANTI

**EFEITO DA FITOTERAPIA SOBRE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS
EM ALVÉOLO DE RATOS IRRADIADOS. ESTUDO MORFOLÓGICO E
MORFOMÉTRICO.**

**Monografia apresentada ao Curso de Odontologia
da Faculdade de Odontologia de Piracicaba –
UNICAMP, para obtenção do diploma de Cirurgião-
Dentista.**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

**Piracicaba
2010**



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

C314e **Cavalcanti, Karine Keila.**
Efeito da fitoterapia sobre parâmetros morfológicos em alvéolo de ratos irradiados: estudo morfológico e morfométrico / Karine Keila Cavalcanti. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.
34f. : il.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Farmacologia. 2. Radiação. 3. Osteorradionecrose. 4. Xerostomia. I. Groppo, Francisco Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

IMPORTANTE

Esta pesquisa recebeu apoio da agência FAPESP para o programa de Iniciação Científica da aluna, sob número 2008/01018-2 e está vinculada a um Projeto de Pesquisa (processo FAPESP número 2007/08024-5 - “Efeito da homeopatia e da fitoterapia sobre parâmetros morfológicos em alvéolo e glândulas salivares de ratos irradiados. Estudo morfológico e morfométrico”), o qual foi executado em conjunto pelos discentes Karine Keila Cavalcanti, Hugo Tadao Futida (processo 2008/01010-1) e Camila Bortoletto Schoba (2008/01020-7), em comum acordo com a FAPESP.

O estudo foi dividido em três partes entre os discentes. Por este motivo, os capítulos “INTRODUÇÃO” e “DISCUSSÃO” são idênticos, sendo que os mesmos foram escritos em conjunto pelos discentes. A aprovação do relatório final da agência FAPESP encontra-se no Anexo 2.

Dedicatória:
Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais. Obrigada por possibilitarem a realização desse sonho, pelo carinho, atenção, compreensão e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço:

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele nada disso seria realizado...

A Unicamp, na figura do Magnífico Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira da Costa, pela recepção e acolhimento e por tornarem possível a pesquisa.

A FOP (Faculdade de Odontologia de Piracicaba), na figura do diretor excelentíssimo Prof Dr Jacks Jorge Júnior, por viabilizarem a execução do projeto.

Ao coordenador do curso, Digníssimo Prof Dr Pablo Agustin Vargas, pela dedicação aos alunos.

Ao Prof. Francisco Carlos Groppo, pela habilidade, paciência e dedicação com que orientou nosso trabalho.

A FAPESP por financiar o projeto e conceder a bolsa para realização do mesmo.

Aos meus pais, pelo apoio, carinho, atenção e compreensão... Não podiam ser melhores...

A minha irmã Angela, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Às minhas queridas amigas, em especial a Ana Carol, pelos momentos felizes e pelos momentos difíceis q passamos juntas, mas nos quais sempre tive seu apoio.

Também agradeço a Lenita, por possibilitar que o trabalho na clínica fosse mais alegre.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Posição dos animais no acelerador linear (A) e posição da placa de chumbo (B). Fonte: Moraes-Ramos (2005).

Figura 2. Posicionamento dos campos para contagem dos campos com tecido ósseo.

Figura 3. Número de campos (mediana \pm desvio interquartílico) com tecido ósseo dos alvéolos dentais.

Tabela 1. Número de campos (mediana \pm desvio interquartílico) com tecido ósseo nos alvéolos dentais.

Figura 4. Exemplos das imagens histológicas obtidas na porção cervical nos períodos estudados, em função dos grupos.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

via ip = via intra-peritoneal

HE = coloração de hematoxilina e eosina

et al = e outros (abreviatura de “*et alii*”)

ORN = abreviação de Osteorradionecrose

in vitro = (“*em vidro*”) é uma expressão latina que designa todos os processos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos

in vivo = (*dentro do vivo*) significa “que ocorre ou tem lugar dentro de um organismo”. Em ciência, *in vivo* se refere a experimentação feita dentro ou no tecido vivo de um organismo vivo, por oposição a um parcialmente ou totalmente morto.

Gy = abreviação de Gray é uma unidade no Sistema Internacional de medidas, que representa a quantidade de energia de radiação ionizante absorvida (ou dose) por unidade de massa.

rad = sigla para *radiation absorbed dose*

DEXA: exame para medir densidade mineral óssea.

CEEA: Comitê de Ética de Experimentação Animal

Ad libitum: expressão latina que significa “*à vontade*”

RESUMO

O desenvolvimento de estudo de radioprotetores efetivos e atóxicos é necessário devido ao grande risco da radiação X (RX) aos seres humanos representado pela exposição à radiação ionizante, quando da radioterapia. Os efeitos deletérios da radiação terapêutica sobre alvéolos pós-extração dental são bem conhecidos. O objetivo dessa pesquisa foi verificar o efeito radioprotetor de uma formulação fitoterápica feita à base de óleo de copaíba, comparando-a com a vitamina E, um conhecido radioprotetor. Foram observados os efeitos destas substâncias sobre a morfologia de alvéolos pós-extração em ratos irradiados com radiação X. Para tanto, foram utilizados 48 ratos divididos nos seguintes grupos: G1 que recebeu NaCl 0,9% (controle - *sham*) e não recebeu radiação; G2 – recebeu NaCl 0,9% e irradiação; G3 – recebeu suspensão de acetato de dl-alfa-tocoferol (vitamina E) 40mg/kg/vo/dia e irradiação; G4 – recebeu óleo de copaíba 2g/kg/vo/dia e irradiação. Todos os tratamentos foram mantidos por sete dias. Ao final deste período, os animais foram anestesiados com uma solução de quetamina/xilasina, posicionados no acelerador linear e, com exceção do grupo 1, receberam 15 Gray de radiação X. Os tratamentos foram mantidos por mais sete dias após a irradiação. Decorridos 3 dias da irradiação, os animais foram submetidos à anestesia com pentobarbital e foi realizada a extração do 1º. molar inferior esquerdo. A mucosa foi suturada e os animais receberam dipirona sódica, via ip. Depois de 7, 14 e 21 dias após a extração dentária (n=4 por grupo), os animais foram novamente anestesiados e sacrificados por aprofundamento da anestesia e sua mandíbula foi cuidadosamente dissecada. As mandíbulas foram submetidas à técnica histológica de rotina (inclusão em parafina). Após processamento histológico de rotina, foram feitos cortes (6 µm) e submetidos à coloração HE. Foram obtidas fotomicrografias para avaliação dos alvéolos. Foram observados três campos com 100 pontos cada, em três lâminas com profundidades de corte diferentes. Os resultados foram descritos qualitativamente (avaliação histológica) e quantitativamente, sendo estes avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis (nível de significância de 5%). Considerando os períodos de 7, 14 e 21 dias, foram observadas as seguintes medianas (desvio interquartilício): G1 - 53.0 (24.3), 52.5 (12.1), 56.0 (20.8); G2 - 3.0 (4.0), 8.5 (4.5), 24.5 (44.8); G3 - 14.0 (31.6), 7.5 (6.3), 11.8 (11.3) e; G4 - 13.9 (5.6), 4.0 (2.3), 11.3 (17.1). De uma forma geral, os tratamentos mostraram maiores quantidades de tecido ósseo que o G2 após 10 e 24 dias, mas não no período 17 dias (Kruskal-Wallis). O G1 foi superior ($p < 0,05$) a todos os tratamentos e G2 em todos os períodos. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre a vitamina E e a suspensão de óleo de copaíba. Concluímos que as suspensões fitoterápica e vitamina E não demonstraram capacidade de radioproteção na reparação óssea alveolar no modelo utilizado no presente estudo.

Palavras - chave: farmacologia; radiação; osteorradionecrose; xerostomia

ABSTRACT

The development of effective study and nontoxic radioprotective is necessary due to the high risk of radiation X (RX) to humans represented by exposure to ionizing radiation, when radiation. The deleterious effects of radiation therapy on post-extraction dental alveoli are well known. The objective of this research was to investigate the radioprotective effect of a herbal formulation made on the basis of Copaiba oil, comparing it with vitamin E, a known radioprotective. We observed the effects of these substances on the morphology of post-extraction alveoli in rats irradiated with X irradiation. Thus, we used 48 rats divided into four groups: G1 received 0.9% NaCl (control - sham) and received no radiation, G2 - received 0.9% NaCl and irradiation; G3 - suspension of acetate-dl alpha-tocopherol (vitamin E) and irradiation 40mg/kg/vo/day, G4 - received the copaiba 2g/kg/vo/day and irradiation. All treatments were maintained for seven days. Thereafter, the animals were anesthetized with a solution of ketamine / xylazine, placed in the linear accelerator and, with the exception of group 1 received 15 Gray of radiation X. Treatments were maintained for more than seven days after irradiation. After 3 days of irradiation, the animals were anesthetized with pentobarbital and was extracted from 1. lower left molar. The mucosa was sutured and the animals received dipyrone, intraperitoneally. After 7, 14 and 21 days after tooth extraction (n = 4 per group), animals were anesthetized and sacrificed by deepening of anesthesia, and his jaw was carefully dissected. The mandibles were subjected to routine histologic technique (paraffin embedding). After histological processing, sections were taken (6 μ m) and subjected to HE staining. Photomicrographs were obtained for evaluation of the alveoli. We observed three fields with 100 points each, three blades with different cutting depths. The results were described qualitatively (histological evaluation) and quantitatively, which were evaluated by Kruskal-Wallis (significance level of 5%). Considering the periods of 7, 14 and 21 days, observed the median (interquartile deviation): G1 - 53.0 (24.3) 52.5 (12.1), 56.0 (20.8), G2 - 3.0 (4.0) 8.5 (4.5) 24.5 (44.8), G3 - 14.0 (31.6) 7.5 (6.3) 11.8 (11.3) and, G4 - 9.13 (5.6) 4.0 (2.3) 11.3 (17.1). In general, the treatments showed higher amounts of bone tissue that G2 after 10 and 24 days, but not within 17 days (Kruskal-Wallis). The G1 was superior (p <0.05) for all treatments and G2 in all periods. There was no statistically significant differences between vitamin E and the suspension of Copaiba oil. We conclude that the suspensions herbal and vitamin E showed no ability to repair radiation protection in alveolar bone in the model used in this study.

Key – words: pharmacology; radiation; osteoradionecrosis; xerostomia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3.1 Fármacos.....	7
3.2 Animais.....	7
3.3 Grupos experimentais.....	7
3.4 Irradiação.....	7
3.5 Extração do primeiro molar inferior esquerdo.....	8
3.6 Obtenção das peças histológicas.....	9
3.7 Processamento do material para microscopia de luz.....	9
3.8 Forma de análise dos resultados.....	10
3.9 Análise quantitativa/qualitativa de tecido ósseo.....	10
4. RESULTADOS.....	11
5. DISCUSSÃO.....	14
6. CONCLUSÕES.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
ANEXO 1: Certificado de ética na experimentação animal.....	23
ANEXO 2: Folha de aprovação da FAPESP.....	24

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Radioterapia e seus efeitos

A radioterapia tem sido uma das formas mais comuns de tratamento dos tumores de cabeça e pescoço, onde tem obtido altos índices de cura e de maior sobrevida. No entanto, a radioterapia envolve riscos em função da quantidade de radiação ionizante absorvida pelos tecidos corporais, a qual pode resultar em danos irreparáveis, pois no campo de radiação está inserido o tecido normal, bem como o tecido alvo (Chow & Theodore, 1998).

O tratamento de tumores da região de cabeça e pescoço por meio da radioterapia causa uma série de efeitos adversos em decorrência da irradiação de estruturas adjacentes a esta região, como as glândulas salivares. Complicações como a xerostomia, mucosites, osteorradição necrose, perda do paladar, disfagia e cáries dentais, são alguns dos efeitos colaterais decorrentes das alterações na estrutura e função das glândulas salivares provocados, na maioria das vezes, em decorrência da diminuição do fluxo salivar (Coppes *et al.*, 2002).

Um fator contribuinte para os efeitos deletérios causados pela radiação está na absorção de radiação pelos tecidos vivos, onde ocorre a ionização e posterior produção de radicais livres no interior das células.

Outros efeitos secundários que podem ocorrer em pacientes irradiados são trismo, alterações vasculares, necrose de tecidos moles e osteorradição necrose (ORN) (Regezi *et al.*, 1976; Sulaiman *et al.*, 2003), este último sendo considerado uma das seqüelas mais graves (Lambert *et al.*, 1997; Thorn *et al.*, 2000; Kanatas *et al.*, 2002; Sulaiman *et al.*, 2003).

As principais causas de ORN são biópsias ósseas, trauma por prótese dentária ou de doenças periodontais e extrações realizadas antes e após a radioterapia (Beumer *et al.*, 1983; Morrish *et al.*, 1981; Epstein *et al.*, 1987; Lambert *et al.*, 1997; Vudiniabola *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2004). Sabe-se que a radiação ionizante também pode induzir à osteomielite, uma inflamação óssea severa que acaba por ter efeitos deletérios no processo de cicatrização pós-extração dentária (Aitasalo *et al.*, 1998).

Devido à radiação ionizante, a cicatrização é diminuída em tecidos traumatizados cirurgicamente, em especial o tecido ósseo, que além de apresentar menor resistência à infecção, pode resultar em radiosteomielite e/ou osteorradição necrose. Assim, um marcante atraso no processo de reparação alveolar

é provocado pela radiação X (Frandsen, 1962; Raveli et al, 1990; Cordeiro et al, 1992; Raveli et al, 1996).

Dentes que não podem ser restaurados devido à cárie, doença periodontal ou lesões de raiz podem resultar em infecções no osso e ORN, devido à baixa progressão vascular e incapacidade dos mecanismos de reparação nos tecidos irradiados (Constantino et al, 1995; Oh et al, 2004).

O conhecimento da dose de radiação, volume, modalidade, urgência, estado geral e prognóstico, desempenham um grande papel na decisão de remoção de dentes (Beumer & Seto, 1981; Sulaiman et al, 2003). A análise do campo de radiação evita procedimentos desnecessários, como extrações realizadas fora da área de radiação, que não constituem um fator de risco (Sulaiman et al, 2003).

Um ponto importante quando se consideram extrações dentárias antes da radioterapia, é o intervalo de tempo entre as extrações dentárias e o início da radiação terapêutica. Este tempo deve ser suficiente para a cura inicial e para permitir que os tecidos suportem a radiação emitida. No entanto, o tempo de reparação não deve ser prorrogado por um longo prazo que comprometa o tratamento e prognóstico (Starcke & Shanon, 1977; Beumer Seto, 1981; Horiot et al, 1981; Beumer et al, 1983; Epstein et al, 1987; Marx & Johnson, 1987; Maxymiw et al, 1991; Constantino et al, 1995; Tong et al, 1999; Reuther et al, 2003).

Radioprotetores

O desenvolvimento de radioprotetores efetivos, e fármacos utilizados para recuperação após radiação têm grande importância, devido sua potencial aplicação em exposição à radiação planejada, radioterapia, por exemplo, ou naquela não planejada com na indústria nuclear, etc. (Arora *et al.*, 2005).

Numerosos fármacos sintéticos e de origem natural, tais como antioxidantes (Kumar *et al.*, 2002), agentes citoprotetivos (Links & Lewis, 1999), inibidores da enzima conversora de angiotensina (Molteni *et al.*, 2000) e antagonistas dos receptores da angiotensina-II (Moulder *et al.*, 1998), elementos metálicos (Miko *et al.*, 1998), imunomoduladores (Furuse *et al.*, 1997; Guenechea *et al.*, 1997; Landauer *et al.*, 1997), compostos sulfidrílicos (Ramnath *et al.*, 1997; Weiss, 1997), lipopolissacarídeos e prostaglandinas (Van Buul *et al.*, 1999; Riehl *et al.*, 2000), vitaminas A, C e E (Haranpanhalli *et al.*, 1994) e ligantes de DNA (Martin & Anderson, 1999) têm sido testados em modelos *in vitro* e *in vivo*, em ensaios com humanos para minimizar injúrias causadas pela exposição à radiação ionizante em

doses subletais e sobreletais (Arora *et al.*, 2005). Combinações de agentes têm sido testadas com pouco sucesso (Weiss *et al.*, 1990; Kumar & Gupta, 2002).

Entre os radioprotetores moleculares, o WR-2721 [S-2-(3-aminopropil-amino) ácido etil-fosforotioico], também conhecido como amifostina, ethiophos (EUA) ou gammaphos (antiga URSS), é a droga radioprotetiva mais profundamente estudada, sendo inicialmente desenvolvida no Instituto de Pesquisas Walter Reed Army, nos EUA, sob os auspícios do programa de desenvolvimento de drogas antirradiação do exército americano. Entretanto, os efeitos radioprotetivos dos compostos fosforotioatos, incluindo a amifostina, são de curta ação e associados com efeitos adversos graves, tais como náusea, vômitos, diarreia, hipotensão, hipocalcemia, nefro- e neuro-toxicidade, em doses clinicamente efetivas. Estas limitações têm restringido grandemente o uso clínico destes fármacos. Apesar destes problemas, a amifostina (Ethyol®) é o único radioprotetor aprovado pela FDA (Arora *et al.*, 2005). O selênio, um metal que atua na enzima glutathione peroxidase, facilita a redução dos peróxidos nos tecidos e pode ser considerado como radioprotetor (Ellenhorn & Barceloux, 1988).

Na tentativa de aumentar a cicatrização após exodontias ou evitar infecções secundárias, a oxigenação hiperbárica, o uso de antibióticos e de remoção profissional de placa tem sido utilizada como coadjuvante na gestão de terapias cirúrgicas em pacientes irradiados (Koga *et al.*, 2008). A oxigenação hiperbárica aumenta a tensão de difusão do oxigênio nos tecidos irradiados, a síntese de colágeno, a vascularização e o metabolismo de redes de osso e, conseqüentemente, a cura dos tecidos (Marx *et al.*, 1985; Lambert *et al.*, 1997; Chavez & Adkinson, 2001).

Packer *et al.* (1979), observou que vitamina E pode 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 que outros derivados ou ácidos graxos polinsaturados. Subseqüentemente, o alfa tocoferol é regenerado pela ação do ácido ascórbico e os radicais são oxidados.

Marcus & Coulston (1996) estudaram as características químicas dos tocoferóis e afirmaram que apresentam potencial antioxidante, o que impede a oxidação de constituintes essenciais, como a ubiquinona (coenzima Q), ou então, impede a produção de produtos tóxicos da oxidação, como os peróxidos. Relatam também, que a vitamina E (tocoferol) evita a formação de radicais livres.

Em um estudo realizado por Manzi (2001), o uso da vitamina E como radioprotetor mostrou que o tecido de granulação, o desenvolvimento e ordenação das fibras colágenas de animais irradiados apresentaram desenvolvimento morfológico semelhante ao de animais não irradiados, com um atraso no processo de reparação apenas no quarto dia.

Até o presente momento, não existe um único agente que preencha todos os requisitos para um radioprotetor ideal, isto é, que produza toxicidade não cumulativa ou irreversível, ofereça proteção por longo período, tenha uma vida de prateleira de 2 a 5 anos e possa ser facilmente administrado (Coleman *et al.*, 2003). Em vista disso, continua a procura por agentes radioprotetores novos, menos tóxicos e mais eficazes.

A copaíba - *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinoideae) - tem vários nomes populares (copaíba-vermelha, bálsamo, oleiro, copaúba, copaíba-da-várzea, entre outros). Sua árvore atinge a altura de dez a quinze metros e sua copa é globosa e densa. Tem grade ocorrência em vários estados brasileiros (Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná). Na realidade, várias plantas são chamadas de Copaíba dependendo da região, sendo todas muito parecidas, com as mesmas aplicações e os mesmos nomes. A Região Norte é a maior produtora do óleo-resina de copaíba. O óleo é, na realidade, um composto óleo-resina obtido do gênero *Copaifera* L. (Leguminosae). As principais espécies fornecedoras do óleo-resina são *C. reticulata* Ducke, *C. guianensis* Desf, *C. multijuga* Hayne e *C. officinalis* L., as quais são responsáveis por 80%, 10%, 5% e 5%, respectivamente, da produção brasileira. Em 2003, foram comercializadas 463 toneladas do óleo-resina

O principal composto entre os vários sesquiterpenos é o beta-cariofileno, seguido do alfa-humeleno, alfa-copaeno, alfa-bergamoteno e delta-cadineno. Entre os diterpenos, foram encontrados o ácido copálico e ácidos cloroquinínicos e covalênicos (Veiga Junior *et al.*, 2007), sendo que a *Copaifera langsdorffii* se mostrou rica em ácido caurenóico - ácido ent-caur-16-en-19-óico (Cavalcanti *et al.*, 2006).

O óleo-resina já demonstrou várias ações farmacológicas, tais como atividade antinoceptiva (Gomes *et al.*, 2007), protetor e regulador do trato gastrintestinal e anti-ulcerogênico (Paiva *et al.*, 2004), antiinflamatório (Lima *et al.*, 2003) e estimulador da cicatrização (Paiva, *et al.* 2002).

Não há relatos de toxicidade (Gomes *et al.*, 2007), sendo que o óleo é capaz

de diminuir os níveis séricos de uréia e de creatinina em roedores submetidos a isquemia renal (Brito *et al.*, 2005). Também não altera os níveis das enzimas hepáticas AST e ALT (de Araújo Júnior *et al.*, 2005). Um dos achados mais importantes é que a administração oral (2 g/kg) mostrou significativa atividade tumoricida (*in vitro* e *in vivo*) em melanoma induzidos em animais (Lima *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi comparar os efeitos radioprotetores de uma preparação fitoterápica à base do óleo de copaíba e de uma formulação de vitamina E (não fitoterápica), sobre o alvéolo dental de ratos irradiados submetidos à extração cirúrgica do 1º molar inferior esquerdo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a execução desta pesquisa, foram colaboradores a Profa. Dra. Solange Maria de Almeida da Área de Radiologia da FOP – UNICAMP, a qual tem ampla experiência na linha de pesquisa envolvendo ratos irradiados, além da aluna de doutorado do Programa de Radiologia da FOP, a CD Letícia Rodrigues Nery. O Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes da área de Morfologia da FOP deu suporte técnico ao estudo. Além destes, colaboraram na fase experimental os alunos de pós-graduação de Odontologia da FOP, o CD Júlio César Leite da Silva e o farmacêutico Paulo César Venâncio.

Este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia/UNICAMP e foi aprovado em 28 de maio de 2007, sob número 1259-1 (ANEXO 1). É importante notar que no referido parecer não consta o nome de todos os integrantes do projeto, mas apenas da Profa. Dra. Solange M. Almeida e da aluna Letícia R. Nery, pois foram as mesmas que ficaram responsáveis em submeter o projeto ao Comitê.

3.1 Fármacos

Foram utilizadas: suspensão de acetato de dl-alfa-tocoferil (vitamina E, Gerson E. Cecon - Farmácia de Manipulação, Limeira, SP) a 80mg/mL em veículo

não oleoso (Gerson E. Cecon - Farmácia de Manipulação, Limeira, SP), óleo de copaíba 2,5%, solução salina (cloreto de sódio – NaCl a 0,9%) estéril, anestésico quetamina (100mg/mL), relaxante muscular xilasina (100mg/mL).

3.2 Animais

Foram utilizados 48 ratos, adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Winstar, SPF) com 6 a 10 semanas de vida, com peso entre 200 a 250g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e passaram uma semana de adaptação ambiental após o transporte, antes do início do experimento. Foram mantidos em regime de água e alimentação *ad libitum*, à temperatura média de 23°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, sendo fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 7 às 19 horas.

3.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de quinze animais. O grupo 1 foi o controle (grupo *sham*), ou seja, os animais receberam solução salina, foram anestesiados e levados ao acelerador linear, mas não foram irradiados. O grupo 2 recebeu solução salina e irradiação como descrito no item 3.4 - "Irradiação"; o grupo 3 foi constituído por animais que receberam vitamina E (acetato de dl-alfa-tocoferil a 80mg/mL) na dose de 40mg/kg/dia/vo e irradiação. O grupo 4 recebeu 0,25 mL do óleo-resina de copaíba a 2,5% na dose 2g/kg/vo e irradiação. Todos os tratamentos foram iniciados sete dias antes do procedimento de irradiação e continuaram por mais sete dias após este procedimento.

3.4 Irradiação

Sete dias após o início dos tratamentos, todos os animais foram anestesiados com xilasina/quetamina, por via intramuscular. Os animais foram posicionados no acelerador linear (Clinic 6/100®, Varian), sendo que o equipamento foi regulado de forma a irradiar uma região de 18 x 30 cm, na qual estava a cabeça e o pescoço dos animais (Figura 1 A). O restante do corpo foi protegido por uma placa suspensa de chumbo de 4 mm de espessura (Figura 1 B). Os animais foram posicionados a uma distância focal de 100 cm. Os animais do grupo 1 (*sham*) foram retirados e os demais receberam uma dose de 15 Gray de radiação X (Moraes-Ramos *et al.*, 2006).

Decorridos 3 dias da irradiação, os animais foram novamente anestesiados e submetidos à extração do primeiro molar inferior esquerdo segundo a técnica descrita por Zecchin *et al.* (2007).



Figura 1. Posição dos animais no acelerador linear (A) e posição da placa de chumbo (B). Fonte: Moraes-Ramos (2005).

3.5 Extração do primeiro molar inferior esquerdo (Zecchin *et al.*, 2007)

Uma solução de clorexidina a 0,2% foi friccionada contra os molares dos animais. O descolamento da mucosa ao redor do molar foi feita cuidadosamente com o auxílio de um *Hollemback* 3ss. O primeiro molar inferior esquerdo foi seccionado com uma broca carbide de ¼ acoplada a uma peça de alta-rotação no projeto piloto. Foi mantida a irrigação constante com solução de NaCl a 0,9% utilizando uma pipeta tipo Pasteur. Após a remoção da porção mesial por uma pinça hemostática curva, a porção distal foi removida utilizando-se o mesmo *Hollemback*. Devido a grande taxa de fratura, optou-se por adaptar a técnica e realizar a extração sem a secção do dente.

A sutura foi feita com fio de seda 5-0, em ponto único e os animais receberam uma injeção intraperitoneal de dipirona sódica como medicação analgésica. A expectativa de dor após extrações dentárias simples é usualmente de 12 horas no máximo (Andrade, 2006) e, desta forma, apenas uma injeção de dipirona foi suficiente para o controle da dor nos animais. A partir da extração, os animais receberam ração triturada e água *ad libitum* durante 48 horas e ração normal após este período.

3.6 Obtenção das peças histológicas

Os animais de cada grupo, divididos em quatro subgrupos de cinco animais cada, foram sacrificados aos 7, 14 e 21 dias após a extração do molar inferior, ou seja, após 10, 17 e 24 dias após a irradiação. O sacrifício ocorreu por aprofundamento da anestesia. Sua mandíbula foi cuidadosamente removida e as peças foram dissecadas, sendo os tecidos moles extrabucais removidos. As peças foram cuidadosamente delimitadas, sendo divididos em partes para facilitar a penetração do fixador.

A fixação foi feita por solução de formol tamponado (pH 7,2) em tampão fosfato de sódio a 0,1M, durante pelo menos 72 horas. As mandíbulas foram submetidas à descalcificação da estrutura em solução de EDTA a 7% e formol a 5% até verificação de completa descalcificação (aproximadamente 30 dias). Após este procedimento, a peça foi delimitada através de uma lâmina, seccionando-se o material excedente.

3.7 Processamento do material para microscopia de luz

As peças removidas foram lavadas em água destilada, desidratadas em etanol a 70%, 95% e 100%, diafanizadas em xilol, embebida e incluídas em parafina a 65°C, em sentido longitudinal. Cortes seriados de 6 µm foram feitos em micrótomo manual (Leica, RM 2145 em lâminas histológicas, que foram desparafinizados, hidratados e) e colhidos corados por Hematoxilina-Eosina para análise da estrutura geral (Michalani, 1980).

Foram realizadas fotomicrografias em cortes histológicos seriados e corados, por meio de fotomicroscópio, empregando-se ocular de 10x e objetiva de 32, 40 e 100 vezes com iluminação convencional. Foram observadas as características histológicas do processo de cicatrização óssea nas lâminas nos diferentes tempos do estudo em cada alvéolo dental.

3.8 Forma de análise dos resultados:

A comparação qualitativa entre os grupos foi subjetiva, isto é, por descrição histológica do tecido em cada grupo. A comparação quantitativa foi feita através do teste de Kruskal-Wallis, considerando um nível de significância de 5%, utilizando o software BioEstat versão 4.0.

3.9 Análise qualitativa/quantitativa do tecido ósseo

As fotomicrografias obtidas em microscopia óptica dos cortes histológicos seriados foram realizadas através de fotomicroscópio Nikon (eclipse E800) e sistema fotográfico Nikon (FDX-35), empregando-se objetiva de 32 vezes e iluminação convencional. As lâminas foram analisadas utilizando o sistema Image Pro-plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Springs). As imagens foram gravadas com uma câmera colorida da marca CoolSNAP-Pro color (Roper Scientific Photometrics) adaptada a um microscópio Eclipse E800 (NIKON), utilizando uma objetiva Nikon de 10X. Uma imagem de um campo vazio foi gravada como referência para correção de sombras e o sistema de medida foi calibrado com o slide de referência antes de ser iniciada qualquer gravação.

Foram avaliados três campos de observação com 100 pontos cada, em cada alvéolo, em três lâminas com profundidades de corte diferentes. Em cada campo de observação foi contado o número de pontos preenchidos por tecido ósseo (valor 1) ou preenchidos por outro tecido (valor 0). Foi obtida uma média da soma do total de pontos em cada profundidade em cada região do alvéolo. A Figura 2 mostra o método utilizado para a contagem dos campos.

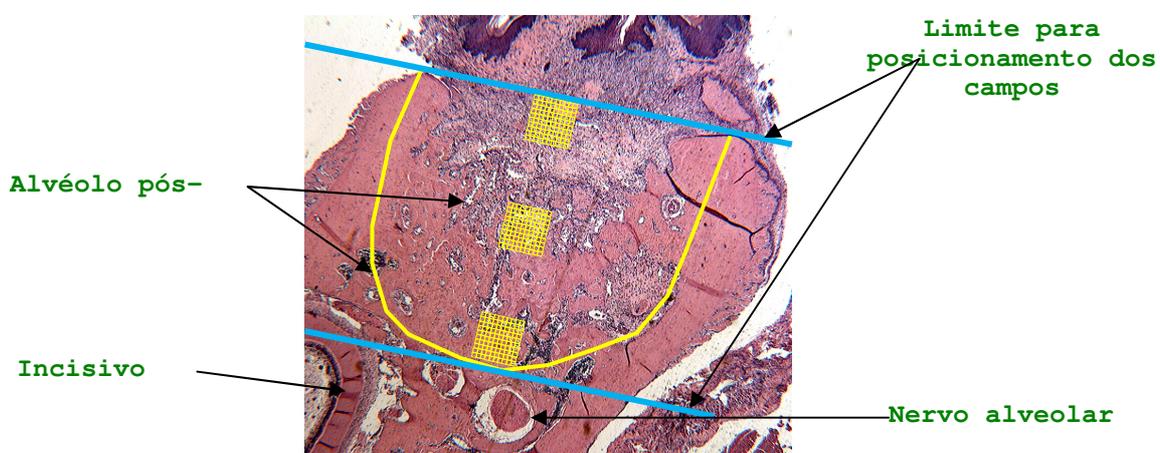


Figura 2. Posicionamento dos campos para contagem dos campos com tecido ósseo.

4. RESULTADOS

A Figura 3 mostra as medianas (\pm desvio interquartílico) das contagens dos campos com tecido ósseo em função dos grupos.

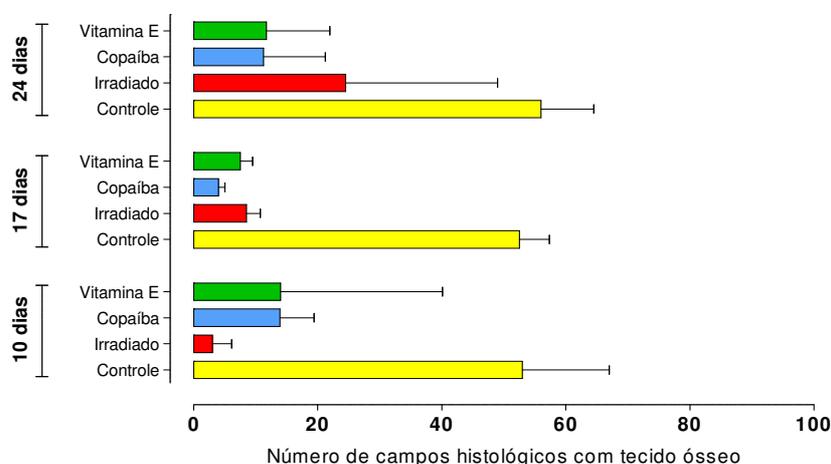


Figura 3. Número de campos (mediana \pm desvio interquartílico) com tecido ósseo dos alvéolos dentais.

A Tabela 1 mostra os mesmos dados que estão apresentados na Figura acima, com a comparação estatística entre os grupos considerando um mesmo período de tempo e entre os períodos considerando um mesmo grupo. Pela Tabela 1 é possível observar que aos 10 dias os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) entre si, mas mostraram quantidade maior de campos ósseos do que o grupo controle irradiado e menor quantidade do que o grupo controle não-irradiado. Entretanto, aos 17 e 24 dias não foi possível observar diferenças na quantidade de campos nos grupos tratados quando comparados ao controle irradiado, indicando que os tratamentos não foram efetivos em manter a quantidade de osso neo-formado aumentada. Além disso, os tratamentos mostraram, nesses períodos, diferenças estatisticamente significantes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) com o grupo controle não irradiado.

A comparação entre os períodos, considerando cada grupo separadamente, mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) para o grupo Controle não irradiado. Houve tendência de maior formação de tecido ósseo ao longo do tempo para o grupo controle não irradiado e a formação óssea não aumentou significativamente após 10 dias do tratamento.

Tabela 1. Número de campos (mediana±desvio interquartílico) com tecido ósseo nos alvéolos dentais.

Grupo	Tempo (em dias)		
	10	17	24
Controle	53.0 (24.3) a,A	52.5 (12.1) a,A	56.0 (20.8) a,A
Irradiado	3.0 (4.0) b,A	8.5 (4.5) b,B	24.5 (44.8) b,AB
Copaíba	13.9 (5.6) c,A	4.0 (2.3) c,B	11.3 (17.1) b,A
Vitamina E	14.0 (31.6) c,A	7.5 (6.2) bc,B	11.8 (11.2) b,A

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Letras minúsculas mostram a comparação entre os grupos.

Letras maiúsculas representam a comparação entre os períodos considerando um mesmo grupo.

A Figura 4 mostra exemplos dos achados histológicos dos grupos em estudo em cada período.

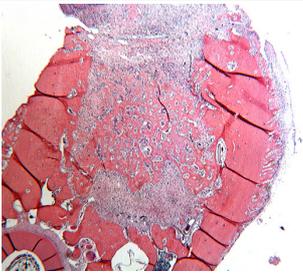
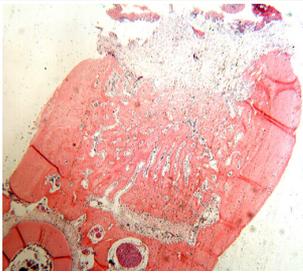
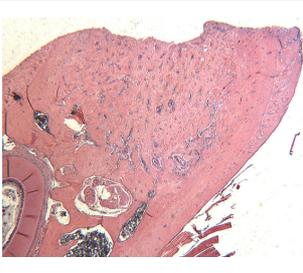
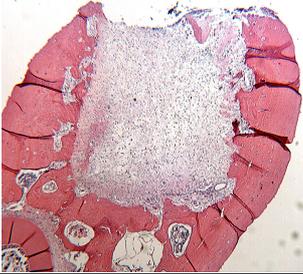
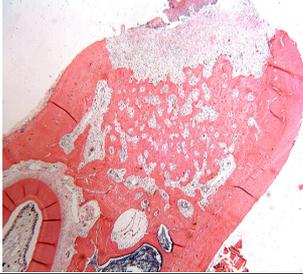
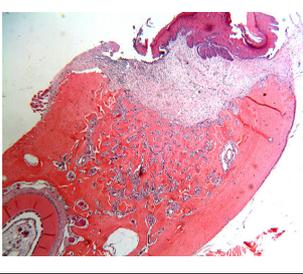
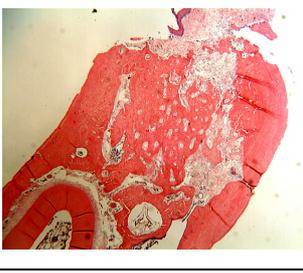
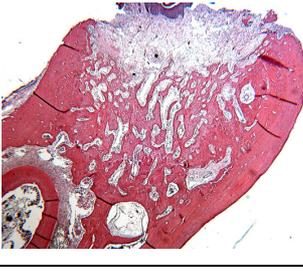
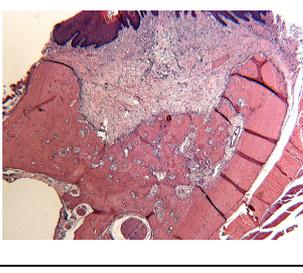
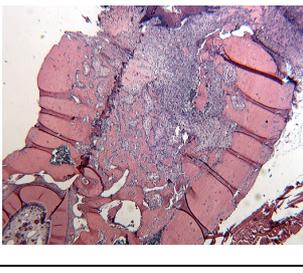
Grupo	Tempo (em dias)		
	10	17	24
Controle não irradiado			
Controle irradiado			
Copaíba			
Vitamina E			

Figura 4. Exemplos das imagens histológicas obtidas na porção cervical nos períodos estudados, em função dos grupos.

É possível observar pela Figura 4 que o grupo controle não irradiado apresentou evolução do processo de cicatrização compatível, sendo que aos 24 dias já havia total maturação do tecido ósseo. Já o grupo controle irradiado apresenta aos 10 dias um nítido atraso no reparo cicatricial, não mostrando neoformação de tecido ósseo. Além disso, aos 24 dias não mostra reparação completa do alvéolo dental. Os grupos “vitamina E” e “óleo de copaíba” não apresentaram homogeneidade no reparo cicatricial, embora tenham mostrado tecido ósseo aos 10 dias quando comparados ao grupo controle irradiado.

5. DISCUSSÃO

Para obtenção de bons resultados em tumores malignos, a radioterapia geralmente está associada à cirurgia. No entanto, ela também envolve certos riscos, dependendo da quantidade de radiação ionizante absorvida pelos tecidos. Algumas vezes, os tecidos podem sofrer danos irreparáveis, já que o tecido normal está presente no campo de radiação, assim como a lesão (Chow & Theodore, 1998). Na tentativa de minimizar esses danos causados pela radiação, novos agentes têm sido pesquisados e uma formulação fitoterápica feita à base de óleo de copaíba foi testada neste estudo.

Devido à radiação ionizante, a cicatrização é diminuída em tecidos traumatizados cirurgicamente, em especial o tecido ósseo, que além de apresentar menor resistência à infecção, pode resultar em radiosteomielite e/ou osteorradionecrose. Assim, um marcante atraso no processo de reparação alveolar é provocado pela radiação X (Frandsen, 1962; Raveli et al, 1990; Cordeiro et al, 1992; Raveli et al, 1996). Vários autores estudaram a ocorrência da osteorradionecrose e puderam concluir que sua incidência é maior quando a extração dentária ocorre após a radioterapia (Thorn et al, 2000; Marx & Johnson, 1987). Por esse motivo, a extração foi realizada após a radioterapia, para podermos avaliar a ação das medicações.

A observação de Packer et al (1979) de que vitamina E poderia ser útil clinicamente ao capturar os radicais peróxidos e quebrar a reação em cadeia da

peroxidação lipídica, deu origem a sua utilização como possível agente radioprotetor. Por esta razão, o óleo de copaíba, conhecido pela grande quantidade de agentes antioxidantes em sua constituição, foi comparado no presente estudo com a vitamina E.

Embora Manzi (2001), tenham mostrado que o uso da vitamina E permitiu o melhor desenvolvimento e ordenação das fibras colágenas em animais irradiados, no presente estudo, estes achados não foram encontrados, provavelmente pelo tipo de lesão induzida. Além disso, neste estudo optamos pela irradiação dos animais previamente ao estabelecimento da ferida cirúrgica, enquanto que a maioria absoluta dos autores observou os tratamentos das feridas antes da irradiação.

O óleo-resina de copaíba demonstrou previamente várias ações farmacológicas, entre elas, como protetor e regulador do trato gastrintestinal e anti-ulcerogênico em um estudo realizado por Paiva *et al.*, em 2004, no qual pode avaliar e comprovar sua ação antioxidante. A sua ação antioxidante foi o que norteou sua escolha no presente estudo, uma vez que muito dos danos causados pela radiação podem ser explicados por reações químicas endógenas que elevam a concentração de radicais livres com alto poder oxidante.

Kumar (1986) relatou que fisiologicamente, podem ser consideradas nove fases fundamentais na evolução do processo de regeneração óssea: hematoma, inflamação, demolição, tecido de granulação osteóide, osteólise/osteogênese, osso fibrilar, osso lamelar, remodelação e adaptação funcional. A rigor, estas fases não são encontradas isoladamente. O estudo do efeito de substâncias farmacológicas que visem proteger o tecido ósseo contra os efeitos deletérios da radiação deve, necessariamente, considerar estes fenômenos. Qualquer uma das fases poderia, teoricamente, contribuir para o entendimento dos fenômenos envolvidos na reparação deste tecido.

Segundo Hupp (1998), o processo de regeneração inicia imediatamente após a extração dental. Nesta fase ocorre a lesão, onde há a hemorragia do local e posterior formação do coágulo sanguíneo. Este é gradualmente invadido por fibroblastos originados por mitose dos fibroblastos pré-existentes e por diferenciação de células adventícias, ambos presentes nos remanescentes do ligamento periodontal. Ao mesmo tempo, ocorre a proliferação de células endoteliais, originando novos capilares. Logo após a estabilização do coágulo o processo inflamatório acontece por meio do substrato natural, e é nessa etapa que se observa os quatro pontos cardeais da inflamação: tumor, calor, rubor e dor. Todas estas

fases foram evidenciadas em todos os animais, independentemente do grupo a que pertenciam, mostrando que a irradiação não bloqueia o processo inflamatório.

Para Raveli *et al.* (1990), o período seguinte ao pós-operatório é um dos mais críticos dentre as fases do processo de reparo, podendo a radiação provocar alterações profundas do ligamento periodontal e de sua capacidade de resposta ao trauma, com reflexos nas demais fases de reparação alveolar. Por isso, optou-se por realizar a irradiação três dias antes da cirurgia neste estudo.

Peterson (2000) considera completa a reparação do alvéolo quando este se encontra totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar remodelada. Isto ocorre por volta de 21 dias pós-extração no rato e 64 dias no homem. Embora o reparo ósseo seja mais rápido no rato, este animal tem sido muito utilizado em modelos experimentais para estudo de substâncias radioprotetoras. Embora mais acelerada, a reparação óssea nos roedores é morfológicamente muito similar à humana. No presente estudo observamos que no 7º dia após a extração dentária a quantidade de tecido ósseo formado se manteve até o 21º dia, inclusive no grupo controle. Em comparação com o grupo que recebeu irradiação, mas não tratamento, foi possível observar uma tendência das substâncias utilizadas em auxiliar na reparação óssea após 7 dias da extração.

Os resultados encontrados no tempo de 14 dias, para o nosso estudo estão de acordo com os observados por Cordeiro *et al.*, em 1992, no qual no grupo controle evidenciou-se trabéculas ósseas neoformadas; e por Raveli *et al.* em 1990, no qual foram encontrados restos de coágulo até 14 dias de pós-operatório no grupo irradiado. Foi observado neste trabalho, que aos 21 dias, o reparo ósseo alveolar mostrava-se bastante evoluído, com o alvéolo quase completamente preenchido de trabéculas ósseas no grupo controle, estando de acordo com os resultados de Carvalho *et al.* (1997), onde mostraram que a neoformação óssea continuou além do tempo de 21 dias. Os grupos irradiados apresentaram-se atrasados em relação aos demais grupos.

Kumar (1986) explica que a neoformação do tecido conjuntivo exibe uma grande quantidade de células, notadamente fibroblastos e capilares neoformados. Ao mesmo tempo, os fibroblastos sintetizam fibras e substância fundamental amorfa. A proliferação e migração dos elementos são oriundas do osso medular, endóstio e perióstio, caracterizando a formação do tecido de granulação com o começo da angiogênese e envio de células mesenquimais e osteoblastos. Partindo para a fase de diferenciação óssea ou mineralização, nas proximidades das paredes alveolares

e, a partir do ápice alveolar, os osteoblastos, originados de células denominadas ósteo-progenitoras, depositam matriz orgânica, formando um tecido osteóide. Com a sua calcificação, processo onde o osteoblasto forma fibras colágenas e osteomucina, são constituídas as trabéculas ósseas. Assim, deve ficar claro que o processo de formação do tecido de granulação e do osteóide é concêntrico, principalmente às expensas dos restos do ligamento periodontal. A radiação poderia interferir em todas estas fases, principalmente suprimindo a função do fibroblasto e das células ósteo-progenitoras. Novamente, um possível campo para o estudo das substâncias radioprotetoras poderia ser o efeito de fármacos sobre estas células, durante o processo de reparo tecidual. Podemos observar nesse estudo que a formação óssea em alguns grupos irradiados, independente da substância radioprotetora utilizada, ocorre do centro para periferia, inverso do que deveria ocorrer.

Durante o processo cicatricial ósseo, para que ocorra a regeneração, certos fatores devem estar sempre presentes em número e qualidade. Sobre esses fatores, pode-se atuar modelando-os de forma a tornar mais previsível a regeneração. Pohle, Ritchie & Wright (1931), Stein, Brady & Raventos (1957), Dotto et al (1970), Moore (1984), Rudolph et al (1988), Ravelli et al (1990), Bernstein et al (1993), Wang et al (1994), Almeida (1997) e Monteiro (1999), mostraram que a irradiação, como fator extrínseco, promove um retardo do processo de reparo alveolar, podendo esse evento ser observado em todos os grupos irradiados nesta pesquisa, confirmando os efeitos deletérios da radiação ionizante.

O uso de radioprotetores efetivos e fármacos utilizados para recuperação após radiação consistem na preocupação em diminuir os efeitos deletérios das radiações ionizantes. Assim, embora a suspensão do óleo de copaíba não tenha mostrado um efeito significativo, outras substâncias naturais devem ser estudadas a fim de verificar sua relevância no tratamento radioterapêutico e nos parâmetros morfológicos da reparação óssea, de particular interesse para a odontologia, bem como da cicatrização em geral.

6. CONCLUSÕES

Este estudo discutiu vários aspectos ligados às radiações ionizantes,

principalmente aquelas utilizadas terapeuticamente, dando ênfase e servindo como base para outras pesquisas que visem o estudo de substâncias farmacologicamente ativas sobre o reparo ósseo após radiação. A partir dos resultados obtidos e dentro das condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que quantitativamente a formulação fitoterápica feita à base de óleo de copaíba não se comportou como um radioprotetor na reparação óssea alveolar.

REFERÊNCIAS¹

1. Andrade ED. Terapêutica medicamentosa em odontologia. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas; 2006.
2. Arora R, Gupta D, Chawla R, Sagar R, Sharma A, Kumar R *et al.* Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother Res.* 2005; 19: 1-22.
3. Balzarini A, Felisi E, Martini A, De Conno F. Efficacy of homeopathic treatment of skin reactions during radiotherapy for breast cancer: a randomised, double-blind clinical trial. *Br Homeopath J.* 2000; 89(1): 8-12.
4. Brito MV, de Moreira RJ, Tavares ML, Carballo MC, Carneiro TX, dos Santos AA. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(3): 243-6.
5. Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha KM *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44(3): 388-92.
6. Coleman NE, Blakely WF, Fike JR, MacVittie TJ, Metting NF, Mitchell JB *et al.* Molecular and cellular biology of moderate-dose (1–10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: Report of a workshop (Bethesda, Maryland, USA, December, 17–18, 2001). *Radiat Res.* 2003; 159: 812-34.
7. Coppes RP, Vissink A, Konings AWT. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. *Radiother Oncol.* 2002; 63: 321-8.
8. de Araújo Júnior FA, Braz MN, da Rocha Neto OG, Costa FD, Brito MV. Copaiba oil effect on aminotransferases of rats with hepatic ischemia and reperfusion with and without ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(1): 93-9.

9. Furuse M, Tsuneoka K, Uchida K, Nomoto K. Acceleration of granulocytic cell recovery in irradiated mice by a single subcutaneous injection of a heat-killed *Lactobacillus casei* preparation. *J Radiat Res.* 1997; 38: 111-20.
10. Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmacol.* 2007; 109(3): 486-92.
11. Guenechea G, Albella B, Bueren JA, Maganto G, Tuduri P, Guerrero A *et al.* AM218, a new polyanionic polysaccharide, induces radioprotection in mice when administered shortly before irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1997; 71: 101-8.
12. Harapanhalli RS, Nara VR, Yaghamai V, Azure MT, Goddu SM, Howell RW *et al.* Vitamins as radioprotectors in vivo: II Protection by vitamin A and soybean oil against radiation damage caused by internal radionuclides. *Radiat Res.* 1994; 139: 115-22.
13. Junqueira LCV, Junqueira LMMS. *Técnicas básicas citologia e histologia.* São Paulo: Santos; 1983. p.50-1.
14. Kanatas AN, Rogers SN, Martin MV. A practical guide for patients undergoing exodontias following radiotherapy to the oral cavity. *Dent Update.* 2002a; 29: 498-503.
15. Kanatas AN, Rogers SN, Martin MV. A survey of antibiotic prescribing by maxillofacial consultants for dental extractions following radiotherapy to the oral cavity. *Br Dent J.* 2002b; 192: 157-60.
16. Kumar KS, Srinivasan V, Toles R, Jobe L, Seed TM. Nutritional approaches to radioprotection: Vitamin E. *Milit Med.* 2002; 167: 57-9.
17. Kumar MHV, Gupta VK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79: 253-60.
18. Lambert PM, Intriere N, Eichstaedt R. Management of dental extractions in irradiated jaws: a protocol with hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55: 268-74.
19. Landauer MR, McChesney DG, Ledney GD. Synthetic trehalose dicorynomycolate (S-TDCM): behavioural effects and radioprotection. *J Radiat Res.* 1997; 38: 45-54.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do ICMJE – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

20. Lima SR, Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res.* 2003; 17(9): 1048-53.
21. Links M, Lewis C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficiency. *Drugs.* 1999; 57: 293-308.
22. Manzi FR. Estudo do efeito radioprotetor da vitamina E (dl-alfa-tocoferil) na reparação tecidual em ratos [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2001. 121p.
23. Martin RF, Anderson RF. Pulse radiolysis studies indicate that electron transfer is involved in radioprotection by Hoechst 33342 and methylproamine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999; 42: 827-31.
24. Michalani G. Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo: Pedagógica e Universitária; 1980.
25. Molteni A, Moulder JE, Cohen EF, Ward WF, Fish BL, Taylor JM *et al.* Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker. *Int J Radiat Biol.* 2000; 76(4): 523-32.
26. Moraes-Ramos FM, Schonlau F, Novaes PD, Manzi FR, Boscolo FN, de Almeida SM. Pycnogenol protects against ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to X-rays. *Phytother Res.* 2006; 20(8): 676-9.
27. Moraes-Ramos FM. Efeito radioprotetor da vitamina E (acetato alfa-tocoferol) na função salivar de ratos [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005. 52p.
28. Moulder JE, Fish BL, Cohen EP. Radiation nephropathy is treatable with an angiotensin converting enzyme inhibitor or an angiotensin II type I (ATI) receptor antagonist. *Radiother Oncol.* 1998; 46: 307-15.
29. Nery LR. Estudo morfométrico das alterações em glândulas sublinguais de rato em relação ao intervalo post mortem e o volume de fixador [dissertação]. Bauru: USP/FOB; 2007. 137p.
30. Paiva LA, de Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytother Res.* 2002; 16(8): 737-9.

31. Paiva LA, Gurgel LA, Campos AR, Silveira ER, Rao VS. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sci.* 2004; 75(16): 1979-87.
32. Ramnath N, Lo Russo, Simon M, Martino S. Phase II evaluation of cisplatin and WR-2721 for refractory metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 1997; 20: 368-72.
33. Regezi JA, Courtney RM, Kerr DA. Dental management of patients irradiated for oral cancer. *Cancer.* 1976; 38(2): 994-1000.
34. Riehl T, Cohen S, Tessner T, Scholemann S, Stenson WS. Lipopolysaccharide is radioprotective in mouse intestine through a prostaglandin mediated mechanism. *Gastroenterology.* 2000; 118: 1106-16.
35. Saitou M, Yanai T, Hasegawa H, Akata N, Kanaiwa-Kudo S, Matsumoto T *et al.* Concentration of metallothioneine in mice livers after small dose of irradiation. *J Radiat Res.* 1998; 39: 239-42.
36. Song LH, Yan HL, Cai DL. Protective effects of soybean isoflavone against gamma-irradiation induced damages in mice. *J Radiat Res (Tokyo).* 2006; 47(2): 157-65.
37. Sulaiman F, Huryn JM, Zlotolow IM. Dental extractions in the irradiated head and neck patient: a retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols, criteria, and end results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61(10): 1123-31.
38. Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: Clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58: 1088-93.
39. Ucuñu H, Ertekin MV, Yoruk O, Sezen O, Ozkan A, Erdogan F *et al.* Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced oral mucositis and myelosuppression: a controlled study in a rat model. *J Radiat Res (Tokyo).* 2006; 47(1): 91-102.
40. Van Buul PPW, Van Duyn-Goedhart A, Shankaranarayanan K. In vivo and in vitro radioprotective effects of prostaglandin E, analogue misoprostol in DNA repair-proficient and – deficient rodent cell systems. *Radiat Res.* 1999; 152: 398-403.
41. Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MG, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera*

- cearensis Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. *J Ethnopharmacol.* 2007; 112(2): 248-54.
42. Weiss JF, Kumar KS, Walden TL, Neta R, Landauer MR, Clark EP. Advances in radioprotection through the use of combined agent regimens. *Int J Radiat Biol.* 1990; 57: 709.
43. Weiss JF. Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. *Environ Health Perspect.* 1997; 105(Suppl 6): 1473-8.
44. Zecchin KG, Jorge RS, Jorge J. A new method for extraction of mandibular first molars in rats. *Braz J Oral Sci.* 2007; 6(21): 1344-8.



CEEA/UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1434-1, sobre "Efeito da homeopatia e fitoterapia sobre parâmetros morfológicos em alvéolo e glândulas salivares de ratos irradiados. Estudo morfológico e morfométrico", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Leticia Rodrigues Nery, 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/Unicamp em 13 de fevereiro de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1434-1, entitled "The effect of homeopathy and phytotherapeutic agents on morphologic parameters of socket and salivary glands of irradiated rats. Morphologic and morphometric study", 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 February 13, 2008.

Campinas, 13 de fevereiro de 2008.


Profa. Dra. Ana Maria Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-070 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6056
E-mail: cometia@unicamp.br
<http://www.unicamp.br/ceea/>

*Recebido
13/02/08
ES*



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2008/01018-2
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fôxo Contínuo
Situação	Encerrado
Vigência	01/07/2008 a 30/06/2009
Beneficiário	Karina Kella Cavalcanti
Responsável	Francisco Carlos Groppo
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOR/UNICAMP

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emite em / por: 2/09/2009 Salvador Granada Junior

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 2	12/08/2009	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável

Comunicamos que seu Relatório Científico foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

Para visualizar o parecer, V.Sa. deve acessar o Sistema SAÓe (www.fapesp.br/saóe), clicar Item do menu Processos: os Processos, clicando em Mais Informações "Consultar Despachos".

Atenciosamente,

Prof. Carlos Henrique de Brito Cruz
Diretor Científico da FAPESP

OBSERVAÇÕES:

Obs.1: "A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador(a), sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o estudante candidato, o qual receberá uma cópia desta mensagem em transcrição do parecer)."

Transcrição de Parecer para o Responsável

Parecer do Relatório Científico

Com o objetivo de determinar um possível efeito radioprotetor do óleo de copaíba na reparação óssea após a extirpação dentária, ratos foram tratados com uma dose do óleo e submetidos à irradiação X. Os resultados foram comparados os obtidos em animais controles ou tratados com uma dose de vitamina E, esta supostamente com atividade radioprotetora. Após a irradiação, os diferentes grupos animais foram submetidos à extração do molar inferior e sacrificados a diferentes intervalos. Os resultados obtidos nas análises histológicas das estruturas mandibulares não revelaram alterações significativas.

...fapesp.br/.../printDispatchExternal.d...

1/2

significativas entre os vários grupos animais. Concluiu-se que, nas doses testadas e no modelo utilizado, o óleo de côco e a vitamina E não apresentaram efeito radioprotetor significativo.

Trabalho desenvolvido de acordo com os objetivos propostos.

Para Relatório FINAL

Em relação à proposta inicial os resultados obtidos estão:

- Acima das expectativas
- Dentro das expectativas
- Aquém das expectativas
- Muito aquém das expectativas

Conclusão

Trabalho compatível com a especialidade e desenvolvido de acordo com o esperado de um projeto de iniciação de pesquisa na área.

Resultado

Aprovado

Frases para o Responsável

Não há frases associadas.

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 2 (Aprovado)

Compromisso	10/08/2009
Período Relacionado	10/12/2008 a 30/06/2009
Situação	Atendido