



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



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

Autor(a): CAMILA BORTOLETTO SCHOBA

UNICAMP

PIRACICABA
2010

Camila Bortoletto Schoba

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

Orientador: Prof. Dr. FRANCISCO
CARLOS GROppo.

Co-orientador: Profa. Dra. SOLANGE
MARIA DE ALMEIDA.

**PIRACICABA
2010**

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

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8^a. / 8099

Sch61e	<p>Schoba, Camila Bortoletto. Efeito da homeopatia sobre parâmetros morfológicos em alvéolo de ratos irradiados: estudo morfológico e morfométrico / Camila Bortoletto Schoba. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. 45f. : il.</p> <p>Orientador: Francisco Carlos Groppo. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Farmacologia. 2. Agentes de radioproteção. I. Groppo, Francisco Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(eras/fop)</p>
--------	---

Dedicatória

“Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais que sempre me apoiaram a superar fases difíceis”.

Agradecimentos

“Agradeço aos meus amigos verdadeiros que sempre estavam prontos pra me ajudar quando eu precisei; e aos professores, dedicados ao ensino e formação dos alunos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba”.

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 homeopática feita à base de radiação X, 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 radiação; G3 – recebeu suspensão de acetato de dl-alfa-tocoferol (vitamina E) 40mg/kg/vo/dia e radiação; G4 – recebeu a formulação homeopática de raios X dinamizada a 15 CH 1mL/kg/vo/dia e radiação. 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 radiação. Decorridos 3 dias da radiação, 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, para observar tecido ósseo. 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 - 7.3 (5.6); 8.5 (7.6), 4.5 (2.6). 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 solução de RX. Concluímos que a solução homeopática e a suspensão de vitamina E não demonstraram capacidade de radioproteção na reparação óssea alveolar no modelo utilizado no presente estudo.

Palavras-Chave: radioprotetores, solução homeopática, vitamina E, alvéolo.

Abstract

New, nontoxic and effective radioprotectors are necessary due to the risks of X radiation (rX) in human beings during radiotherapy. The deleterious effects of therapeutic radiation in the bone post-dental extraction are well known. The aim of the present study was to compare the radioprotective effect of an X-ray homeopathic formulation with E vitamin. The effect of both substances was observed over the rat dental-alveolus post-extraction irradiated with X rays. Forty-eight rats were divided into the following groups: G1 – received 0.9% NaCl (control - sham) without X radiation; G2 – 0.9% NaCl with X radiation; G3 – received the suspension of 40mg/kg/vo/day dl-alpha-tocopherol (vitamin E) acetate and X radiation; G4 – received the 15CH X-ray homeopathic solution 1mL/kg/vo/day and X radiation. All treatments were kept during seven days and, after that, the animals were anesthetized, positioned on linear accelerator and received 15 gray of X radiation (except for G1). The treatments were kept for more seven days after irradiation. After three days of radiation, the animals were anesthetized and the first left-inferior molar was extracted. The animals received sodium dypirone i.p. and, after 7, 14 and 21 days after dental extraction, the animals (n=4) were anesthetized, killed and the mandibles were carefully removed. The samples were submitted to routine histological techniques and photomicrographies were used to evaluate dental alveoli. Three sites with 100 points were observed in three slides with different depth sizes, in order to observe osseous tissue. Results were described qualitatively and quantitatively. Kruskal-Wallis test ($\alpha=5\%$) was used. Considering 7, 14 and 21 days, the following medians (interquertilic deviation) were observed: 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 - 7.3 (5.6); 8.5 (7.6), 4.5 (2.6). The treatments provided more osseous tissue than the G2 after 7 and 21 days, but not after 14 days. G1 was superior to all the treatment and G2 in all periods. No statistically significant differences were observed between vitamin E and rX homeopathic solution.

We concluded that the homeopathic solution and E vitamin did not radioprotective properties on the alveolar bone repair in the model used in the present study.

Sumário

1. Introdução e Revisão de Literatura-----	11
2. Proposição-----	21
3. Material e Métodos-----	21
4. Resultados-----	25
5. Discussão-----	28
6. Conclusão-----	32
7. Referencias-----	33

1. Introdução e Revisão de 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, osteorradionecrose, 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 osteorradionecrose (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 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).

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, hipocalemia, 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 glutatona 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 eficácia do tratamento homeopático (beladona CH7 e RX CH15) nas reações da pele durante a radioterapia de câncer de mama (radiodermatite aguda) foi estudada por Balzarini *et al.* (2000). Utilizando estudo duplo cego ao acaso, envolvendo 66 pacientes que foram operados de câncer de mama e submetidos à radioterapia, mostraram que houve uma tendência de melhora com a homeopatia, embora não estatisticamente significativa, em relação ao placebo. Assim, não há evidência conclusiva sobre sua eficácia.

Samuel Hahnemann (1755 - 1843 d.C.), médico alemão, desenvolveu a terapêutica baseada na lei dos semelhantes, a qual serviu como base para criar a Homeopatia. Esta consiste num sistema terapêutico que visa tratar as doenças por meio de substâncias ministradas em doses diluídas a ponto de se tornarem infinitesimais, capazes de produzir, em indivíduos sãos, quadros clínicos semelhantes aos que apresentam os doentes a serem tratados.

A escala centesimal criada por Hahnemann consiste da diluição seriada da substância em teste em 99 partes de um veículo alcoólico e de sucussão (agitação do frasco, cem vezes a cada diluição). Os símbolos empregados para indicar a escala centesimal são C30, 30C, CH30, 30CH ou apenas 30, sendo que todas estas conotações têm o mesmo significado.

Abaixo se encontra uma relação de exemplo das conotações e suas respectivas diluições:

1CH = 1/100 ou 1.10^2 ou 1% ou 1000mg/100mL;
2CH = 1/10.000 ou 1.10^4 ou 0,01% ou 10mg/100mL;
3CH = 1/1.000.000 ou 1.10^6 ou 0,0001% ou 100µg/100mL;
4CH = 1/100.000.000 ou 1.10^8 ou 0,000001% ou 1µg/100mL; e assim por diante.

Os medicamentos homeopáticos parecem ser úteis na gestão de doenças maligna, ajudando na condição geral do paciente, amenizando os sintomas e no cuidado terminal. Não são usados medicamentos específicos para o câncer, a utilização do tratamento é constitucional, com base na totalidade dos sintomas. A continuidade pode ser avaliada pela resposta inicial do remédio. Respondendo

bem ao tratamento, um prognóstico favorável indica a continuidade da receita (Rajendran, 2004).

Reparação Óssea

O processo de reparo alveolar apresenta três modalidades, a cicatrização, a reparação e a regeneração. A cicatrização consiste na substituição do tecido lesado por um tecido conjuntivo fibroso (tecido cicatricial), já na reparação, os tecidos apresentam capacidade de repor suas estruturas lesadas por outro tecido semelhante ou não, contrário da regeneração, que repõe a estrutura lesada por um tecido com morfo-funcionalidade idêntica ao que existia. A evolução do reparo em feridas de extração dental apresenta quatro fases: a proliferação celular, o desenvolvimento do tecido conjuntivo, a maturação do tecido conjuntivo e a diferenciação óssea, sendo que estas não ocorrem isoladamente (Robbins et al., 1986, Groppo et al., 1993).

O processo de reparação alveolar foi estudado por muitos pesquisadores a fim de entender e justificar a atividade celular e a influência dos medicamentos na reparação. Para verificar a eficácia do método densiométrico, através do estudo da mineralização no processo de reparo em feridas de extração dentária em ratos, Carvalho (1980) utilizou 30 ratos cujos incisivos superiores direitos foram extraídos, sendo esses sacrificados nos tempos de 0, 6, 12, 18, 21 e 24 dias pós-operatórios. As peças contendo o alvéolo foram radiografadas e incluídas em parafina. Observado o resultado densiométrico, encontrou-se um aumento na densidade óptica das imagens nos terços alveolares entre 0 e 6 dias, decrescendo até 21 dias. Histologicamente encontrou-se que, imediatamente ao pós-operatório, o alvéolo estava completamente preenchido por coágulo, aos 18 dias quase toda a extensão alveolar encontrava-se preenchida por trabéculas ósseas e aos 24 dias o trabeculado ósseo encontrava-se maduro. Concluiu-se que a metodologia densiométrica é bastante eficaz quando comparada com os resultados histológicos.

Guglielmotti et al (1986) determinaram, por meio de método radiográfico,

histológico e histométrico, a resposta do tecido ósseo durante a cicatrização alveolar após diferentes doses de radiação X aplicada após a extração dental em ratos. Os animais do grupo controle foram submetidos apenas a cirurgia e os demais foram irradiados na região da cabeça com 15, 20 ou 30Gy de radiação X aos 0, 3 ou 7 dias posteriores a cirurgia. Os animais foram sacrificados 14 dias após a cirurgia. Todos os animais dos grupos controle e 7 dias sobreviveram até o final da pesquisa, já os animais que receberam 20 ou 30Gy aos 0 e 3 dias após a cirurgia morreram antes do final do experimento. Em todos os métodos de avaliação, quando comparado ao controle, a cicatrização alveolar apresentava-se mais atrasada nos grupos irradiados, sendo mais evidente nos grupos irradiados 0 e 3 dias após a extração. Além disso, a porcentagem de formação óssea encontrava-se diminuída quanto maior era a dose de radiação. Portanto, recomenda-se que a irradiação não deve ser iniciada em menos de uma semana após a extração dentária.

Johansen, em 1970, realizou um estudo a fim de esclarecer a proliferação celular na reparação alveolar pós-extração e estruturas envolvidas. Foram utilizados 18 ratos dos quais foram extraídos os primeiros molares inferiores esquerdos e após isso, foram sacrificados em um período que variou de 0 a 20 dias após a extração. O primeiro molar do lado direito permaneceu intacto e foi utilizado como controle. A análise dos resultados mostrou que, após um dia o alvéolo era preenchido por coágulo sanguíneo contendo filamentos de fibrina e células sangüíneas, e ao longo do osso alveolar, tecido conjuntivo e células endoteliais foram encontradas entre o remanescente das fibras do ligamento periodontal. No 2º-dia, tanto o epitélio juncional quanto o epitélio oral da gengiva estavam em proliferação para revestir a ferida da extração. Após 4 dias o epitélio revestia a ferida da extração e a queratinização já havia se iniciado, sendo completa aos 11 dias após a cirurgia. Após 3-4 dias a formação óssea iniciava-se ao longo da parede alveolar, enquanto a reabsorção era observada em outras partes e no 6º-dia, o alvéolo já era preenchido por novo osso. Essa formação óssea ocorria diretamente sobre a parede alveolar original e nenhuma atividade osteoclástica prévia parecia essencial para este processo. Observou-se também

que na superfície da crista alveolar notável formação óssea ocorreu entre o 6º e 21º dia pós-cirúrgico.

Starcke & Shannon (1977) avaliaram a resposta pós-irradiação de pacientes que receberam radiação diretamente no local cirúrgico, e que tiveram dentes removidos, assim como as seqüelas intraoral em relação ao período de tempo entre as extrações e o início da radioterapia, num total de 62 pacientes com tumor na região de cabeça e pescoço. A dose média de irradiação recebida pelos pacientes foi de 6000 rads e o intervalo entre a extração e o início da irradiação variou de 5 a 72 dias. Somente um paciente desenvolveu necrose após a radioterapia, sendo que tal acontecimento não estava relacionado à extração pré-irradiação. Os resultados indicaram que o tempo de cicatrização entre as extrações e o início da radioterapia pode não ser crítico, uma vez que a exodontia pré-irradiação não pôde ser associada com o aumento das sérias seqüelas pós-irradiação, visto que a incidência de osteorradionecrose nestes pacientes foi extremamente baixa. Os autores sugerem que um intervalo de 10 a 14 dias de cicatrização entre as extrações e a radioterapia seja adequado. Porém, quando isto não for possível, assim como quando é indicada a urgência da radioterapia, um menor tempo de cicatrização não está, necessariamente, associado com maior risco de seqüelas e não deve ser considerado como completamente inaceitável.

Bodner et al (1993) avaliaram, por meio de um método radiográfico, as alterações que ocorrem durante a cicatrização alveolar após extração dental. Foram utilizados 35 ratos, onde os molares inferiores esquerdo foram extraídos e sacrificados aos 0, 7, 14, 21, 28, 45 e 60 dias após a cirurgia. Depois da remoção das mandíbulas, foram radiografadas junto com uma escala de alumínio para análise da densidade alveolar. Nos resultados, aos sete dias foi observado aumento da densidade da imagem das áreas apical e de crista do alvéolo, indicando a neoformação óssea. Na área apical a densidade máxima foi alcançada no 28º dia pós-extração. Na área de crista a densidade aumentou em velocidade mais lenta durante todo o experimento sendo significativamente menor, quando comparado a área apical, entre o 7º e o 45º dias pós-cirúrgico, já

em 60 dias a diferença não foi significativa. Concluiu-se que as alterações de densidade estavam de acordo com os achados histológicos descritos para a cicatrização alveolar em ratos.

Lorente et al (1992) desenvolveram um método para avaliar a mandíbula de ratos irradiados examinando a contribuição do perióstio, do tecido mole e do osso, na reparação de um defeito ósseo em uma área irradiada. Foi avaliado o efeito do tempo de reparação de cirurgia após irradiação usando pó de osso desmineralizado irradiado ou não. Os animais foram irradiados com dose total de 45Gy de Cobalto 60 e a cirurgia para produção do defeito ósseo no ramo mandibular foi realizada 2 ou 4 semanas depois de completada a irradiação, sendo o sacrifício feito 4 semanas após a cirurgia. A melhor reparação do defeito ósseo ocorreu no grupo controle no qual foi produzido apenas o defeito ósseo e não foi irradiado e não houve enxerto com pó de osso desmineralizado. Em mandíbulas não irradiadas e preenchidas por pó de osso desmineralizado não irradiado a região sem osso sólido era significativamente menor, entretanto a reparação do defeito ósseo nesse grupo foi superior ao grupo tratado com pó de osso desmineralizado não irradiado em mandíbula irradiada e, por último, na mandíbula não irradiada com pó de osso desmineralizado irradiado. Sendo assim o leito não é o fator limitante em reparação de defeitos ósseos, podendo o componente osteogênico de osso no pó de osso desmineralizado ser mais afetado pela irradiação. No leito irradiado, o defeito produzido 2 semanas após irradiação curou-se mais rapidamente do que aqueles realizados 4 semanas. Portanto, o tempo para realização da cirurgia após irradiação também desempenha importante papel no processo de reparação, com cirurgia prematura produzindo melhores resultados.

Analisando o efeito da radiação ionizante na reparação alveolar Raveli et al (1989) avaliaram a influência da radiação X na cronologia do processo de reparo alveolar, onde foram utilizados 60 ratos e seus incisivos superiores direitos extraídos. Os animais foram divididos em três grupos: grupo I – controle, grupo – II recebeu 1,25 Sv e grupo – III recebeu 1,75 Sv de radiação imediatamente após as extrações. O sacrifício ocorreu após 3, 7, 14 e 28 dias

após a cirurgia. No presente estudo concluiu-se que, nos grupos irradiados, houve retardo na proliferação epitelial da mucosa gengival e também na cronologia do processo de reparo alveolar, o qual aumentado em doses maiores.

Cordeiro et al (1992) analisaram histomorfologicamente a cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental, onde foram extraídos os incisivos superiores direitos de 50 ratos, divididos em dois grupos e sacrificados com 1, 3, 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. O grupo I, foi o controle e o grupo II, foi irradiado com 1,8 Gray de radiação no corpo inteiro. Concluiu-se que os ratos do grupo irradiado apresentaram um atraso na organização do coágulo e proliferação do epitélio, onde em 28 dias, enquanto o grupo I apresentava três terços alveolares preenchidos por trabéculas ósseas, o grupo II ocupava apenas metade do alvéolo.

Drake & Scot (1995), alertaram sobre as complicações nas lesões pré e pós-cirúrgicas, afirmando que quando a radioterapia é realizada imediatamente antes ou após a cirurgia, as complicações aumentam pela alteração permanente dos fibroblastos e com uma deficiente produção de colágeno, resultando em uma resposta celular inadequada.

Carvalho et al. (1997) realizaram uma pesquisa com o objetivo de quantificar o tempo de reparo de ferida dental nos terços apical, médio e cervical do alvéolo de ratos, usando um método de contagem de pontos. Para a realização desse trabalho foram extraídos os incisivos superiores direitos dos ratos e esses foram sacrificados com 1, 2, 3 e 6 semanas após a cirurgia, com 5 a 7 ratos por grupo. Os autores observaram que após duas semanas, o alvéolo apresentava-se igualmente ocupado com tecido conectivo maduro e trabeculado ósseo, e que nas 3^o e 6^o semanas o alvéolo estava preenchido por osso trabecular espesso.

Outro estudo envolvendo molares superiores extraídos após radiação mostrou que há um atraso no reparo alveolar em dentes extraídos após radiação X, quando comparados a dentes não irradiados. Para tal resultado, Kurihashi et al (2002), utilizou 18 ratos e os dividiu em dois grupos, 9 irradiados e 9 não irradiados. A dose de radiação foi de 10 Gy e a extração foi feita após 7 dias,

sendo o sacrifício nos tempos 3, 7, e 14 dias de pós-operatório.

Elsubeihi & Heersche (2004) concluíram, por meio de uma pesquisa envolvendo extração de molares e incisivos do mesmo lado na mandíbula, que o ganho máximo de novo osso ocorreu nos primeiros 56 dias diminuindo até 112 dias do pós-cirúrgico. Para tal, foi avaliada quantitativamente a cicatrização alveolar após a extração e sacrifício dos ratos nos tempos 0,14, 28, 56 e 112 dias. Mensurações histomorfológicas detectaram diferenças significativas no volume total ósseo entre 14 e 56 dias, enquanto o DEXA (exame para medir a densidade mineral óssea) não detectou tais diferenças. Isso sugere que embora esse exame possa ser usado para avaliar quantitativamente a cicatrização alveolar da mandíbula em ratos, a mensuração histomorfométrica de volume ósseo é mais confiável na discriminação de pequenos aumentos na neoformação óssea.

2. Proposição

O propósito do presente estudo foi comparar os efeitos radioprotetores de uma preparação homeopática feita a partir da dinamização de RX em 15CH com a vitamina E, sobre o alvéolo dental de ratos irradiados submetidos à extração cirúrgica do 1º molar inferior esquerdo.

3. Materiais e Métodos

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.

Fármacos

Foram utilizadas: solução de raios X dinamizados em 15CH (Gerson E. Cecon - Farmácia de Manipulação, Limeira, SP), 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), solução salina (cloreto de sódio – NaCl a 0,9%) estéril, anestésico quetamina (100mg/mL), relaxante muscular xilasina (100mg/mL).

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.

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 3.1.5 - "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 (aproximadamente 1mL/kg) da solução de raios X dinamizada em 15 CH por via oral e irradiação. Todos os tratamentos foram iniciados sete dias antes do procedimento de irradiação e continuaram por mais sete dias após este procedimento.

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).

Extração do Terceiro 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 Holleback. 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 receberão 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.

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 extrabuciais 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.

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) e colhidos em lâminas histológicas, que foram desparafinizados, hidratados e 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.

4. Resultados

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

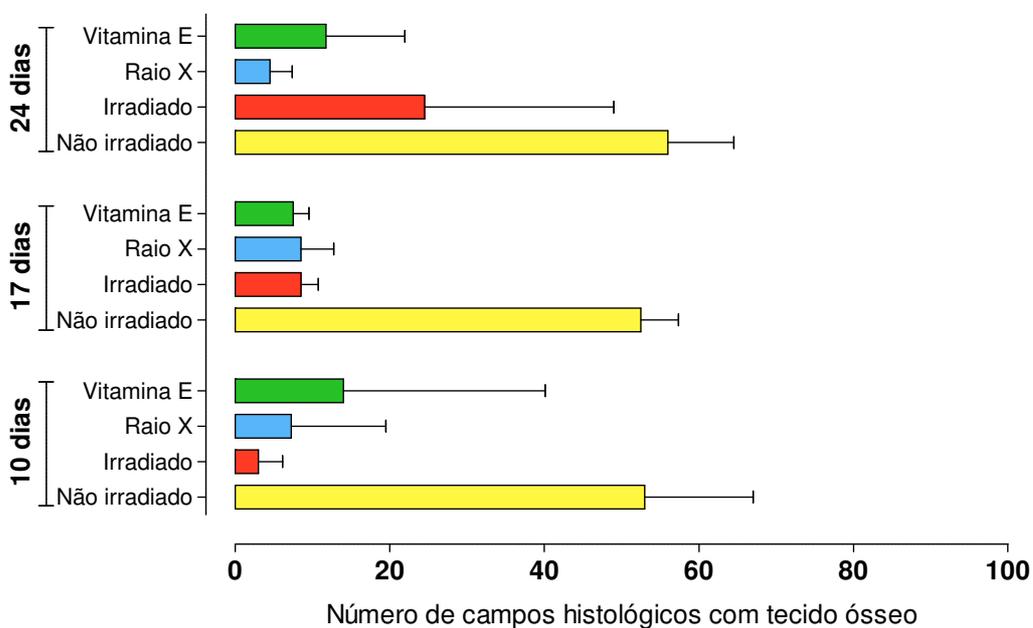


Figura 3. Número de campos (mediana \pm desvio interquartílico) com tecido ósseo dos alvéolos dentais.

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 é possível observar que aos 10 e 24 dias após a irradiação, 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. Aos 17 dias não foi possível observar diferenças na quantidade de campos nos grupos tratados quando comparados ao controle irradiado.

A comparação entre os períodos, considerando cada grupo separadamente, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa (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 para os tratamentos.

Tabela 1. Número de campos (mediana e 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,AB	24.5 (44.8) b,B
Raio X	7.3 (5.6) c,A	8.5 (7.6) b,A	4.5 (2.6) c,A
Vitamina E	14.0 (31.6) c,A	7.5 (6.3) b,B	11.8 (11.3) bc,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.

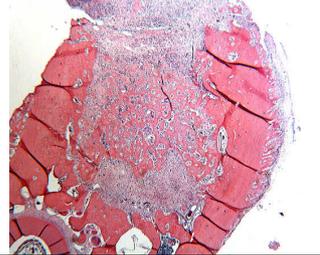
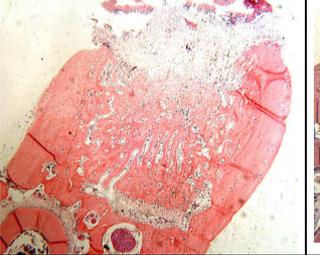
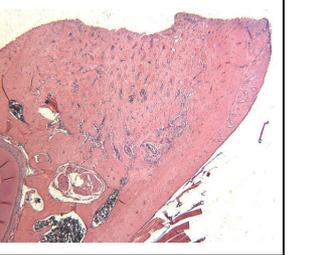
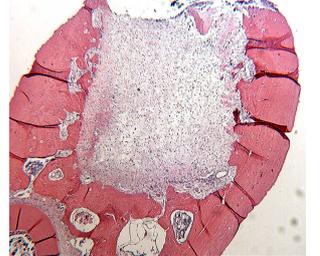
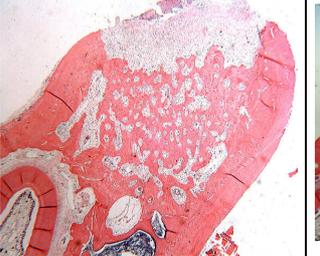
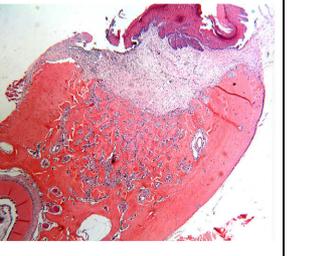
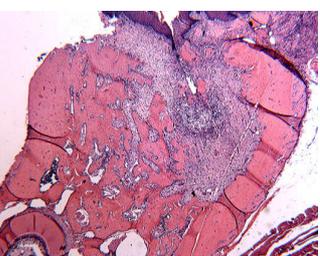
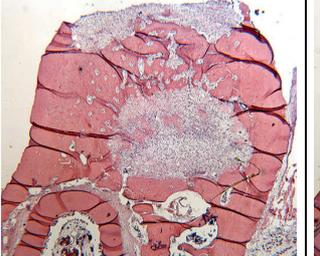
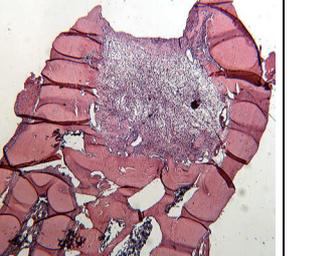
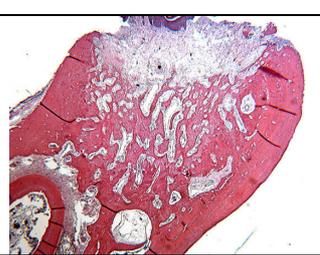
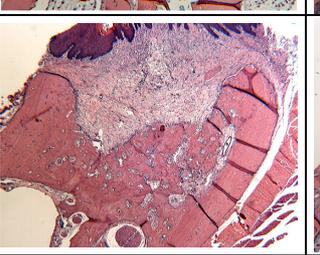
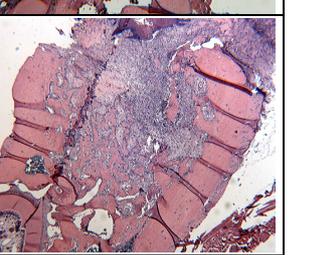
Grupo	Tempo (em dias)		
	10	17	24
Controle não irradiado			
Controle irradiado			
Raio X			
Vitamina E			

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 solução homeopática de raios X não apresentam homogeneidade no reparo cicatricial, embora se apresentem com mais quantidade de 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 riscos, dependendo da quantidade de radiação ionizante absorvida pelos tecidos. Os tecidos podem sofrer danos irreparáveis, já que, assim como a lesão, o tecido normal está presente no campo de radiação (Chow & Theodore, 1998). Na tentativa de minimizar esses danos causados pela radiação, foi utilizada neste estudo uma formulação homeopática feita à base de radiação X, comparando-a com a vitamina E, um conhecido radioprotetor.

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). 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, no presente estudo foi realizada a irradiação três dias antes da cirurgia.

A eficácia do tratamento homeopático (beladona CH7 e RX CH15) nas reações da pele durante a radioterapia de câncer de mama (radiodermatite aguda) foi estudada por Balzarini *et al.* (2000). Os medicamentos homeopáticos apresentaram utilidade na gestão de carcinomas, ajudando na condição geral do paciente, amenizando os sintomas e no cuidado terminal. Estes medicamentos não são específicos para o câncer, sendo sua utilização constitucional e baseada na totalidade dos sintomas. A continuidade pode ser avaliada pela resposta inicial ao medicamento. Uma vez que haja boa resposta, um prognóstico favorável indica a continuidade do uso (Rajendran, 2004). No presente estudo, não houve como observar estas características por se tratar de um estudo agudo, sem a presença da lesão carcinomatosa e realizado em animais.

Kumar (1986) relatou que fisiologicamente, poderiam 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 principais da inflamação: tumor, calor, rubor e dor. Foi demonstrado previamente que a irradiação do tecido não bloqueia o processo inflamatório, mas o atenua significativamente. Este fato pode ser corroborado no presente estudo, pois as fases inflamatórias foram evidenciadas em todos os animais, independentemente do grupo a que pertenciam.

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. Entretanto, os grupos irradiados mostraram atraso em relação ao controle não irradiado.

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, endósteo e periósteo, 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, parece ocorrer do centro para periferia, ou seja, de maneira inversa ao normal.

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. No presente estudo, embora não tenha mostrado efeito muito significativo, é importante salientar que a solução de raio X não diferiu da vitamina E que é o mais conhecido radioprotetor.

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 solução de raios X 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 homeopática feita à base de radiação X não se comportou como um radioprotetor na reparação óssea alveolar.

7. Referencias

01. Aitasalo K, Niinikoski J, Grénman R, Virolainen E.. A modified protocol for early treatment of osteomyelitis and osteoradionecrosis of the mandible. *Head Neck*. 1998 Aug;20(5):411-7.
02. Andrade ED. *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas. 2006 2.ed..
03. Arora R, Gupta D, Chawla R, Sagar R, Sharma A, Kumar R, Prasad J, Singh S, Samanta N, Sharma RK.. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother Res* 2005 19: 1–22.
04. 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.
05. Beumer J, Seto B.. Dental extractions in the irradiated patient. *Spec Care Dentist*. 1981 Jul-Aug;1(4):166-73.
06. Beumer J 3rd, Harrison R, Sanders B, Kurrasch M. Preradiation dental extractions and the incidence of bone necrosis. *Head Neck Surg*. 1983 Jul-Aug;5(6):514-21.
07. Bodner L, Dayan D, Pinto Y, Hammel I. Characteristics of palatal wound healing in desalivated rats. *Arch Oral Biol* 1993 38:17–21.
08. Carvalho, E.L.S. *et al.*,. Anti ulcer activity of dried extracts from *Maytenus ilicifolia* in rats. WOCMAP II. Mendoza-Argentina 1997. P-339.
09. Chavez JA, Adkinson CD. Adjunctive hyperbaric oxygen in irradiated patients requiring dental extractions: outcomes and complications *J Oral Maxillofac Surg*. 2001 May;59(5):518-22; discussion 523-4.
10. Chow H, Theodore LP. Oral cavity cancer. In: Steven AL, Theodore LP, editors. *Textbook of radiation oncology*. Philadelphia: Saunders; 1998; 457-96.
11. Coleman NE, Blakely WF, Fike JR, *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: 812–834.

12. Coppes RP, Vissink A, Konings AWT.. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. *Radiotherapy and Oncology* 2002 63: 321-328.
13. Cordeiro R, Ferreira B, Raveli D, Okamoto T. Estudo Histomorfológico da cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental de ratos expostos à radiação X no corpo todo. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1992; 6(1/2): 13-8.
14. de Carvalho A, de Castro AL, dos santos Pinto MC. Mineralization in the repair process of tooth extraction lesions in rats. Contribution to densitometric study] *Ars Curandi Odontol*. 1980 Oct;7(7):304-5, 308-12. Portuguese.
15. Ellenhorn MJ, Barceloux DG. Medical toxicology: diagnosis and treatment of human
1. poisoning. New York: Elsevier; 1988. 1512 p.
16. Elsubeihi ES, Heersche JN. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. *Arch Oral Biol*. 2004 May;49(5):401-12.
17. Epstein JB, Rea G, Wong FL, Spinelli J, Stevenson-Moore P. Osteonecrosis: study of the relationship of dental extractions in patients receiving radiotherapy. *Head Neck Surg*. 1987 Sep-Oct;10(1):48-54.
18. Frandsen A. M. Periodontal tissue changes induced in young rats by roentgen irradiation of the molar regions or the head. *Acta Odontol Scand*. 1962 Nov;20:393-410.
19. 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: 111–120.
20. Groppo, F. C.; Abreu, E M; Andrade, E D. Efeitos de duas preparações farmacêuticas, à base de triancinolona ou ácido acetilsalicílico, sobre o processo de reparo alveolar dental perturbado, em ratos.. *Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilofacial*, Lisboa - Portugal, v. 34, n. 3, p. 161-166, 1993.

21. Guglielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL: Alveolar wound healing after X-irradiation. *J Oral Maxillofac Surg* 44: 972-976, 1986.
22. Guenechea G, Albella B, Bueren JA, *et al.*. AM218, a new polyanionic polysaccharide, induces radioprotection in mice when administered shortly before irradiation. *Int J Radiat Biol* 1997 71: 101–108.
23. Harapanhalli RS, Nara VR, Yaghmai V, *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: 115–122.
24. Horiot JC, Bone MC, Ibrahim E, Castro JR. Systematic dental management in head and neck irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1981 Aug;7(8):1025-9.
25. Johansen, J. R. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol. Scand.*, Oslo, v. 28, n. 4, 441-461, Aug. 1970.
26. Kanatas, A.N.; Rogers, S.N.;Martin, M.V.. A practical guide for patients undergoing exodontia following radiotherapy to the oral cavity. *Dent Update, Guildford*, v. 29. n. 10. p. 498-503, Dec. 2002.
27. Koga F, Kihara K, Fujii Y, Yoshida S, Saito K, Masuda H, Kageyama Y, Kawakami S.. Favourable outcomes of patients with clinical stage T3N0M0 bladder cancer treated with induction low-dose chemo-radiotherapy plus partial or radical cystectomy vs immediate radical cystectomy: a single-institutional retrospective comparative study. *BJU Int.* 2009 Jul;104(2):189-94. Epub 2008 Dez. 22.
28. Kumar KS, Srinivasan V, Toles R, Jobe L, Seed TM.. Nutritional approaches to radioprotection: Vitamin E. *Milit Med* 2002 167: 57–59.
29. Kumar MHV, Gupta VK.. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. *J Ethnopharmacol* 2002 79: 253–260.
30. Kurihashi T, Iwata H, Nasu M, Yosue T. Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after X-ray irradiation. *Odontology.* 2002 Sep;90(1):35-42.

31. Lambert BL, Salmon JW, Stubbings J, Gilomen-Study G, Valuck RJ, Kezlarian K. Factors associated with antibiotic prescribing in a managed care setting: an exploratory investigation. *Soc Sci Med*. 1997 Dec;45(12):1767-79.
32. Landauer MR, McChesney DG, Ledney GD.. Synthetic trehalose dicorynomycolate (S-TDCM): behavioural effects and radioprotection. *J Radiat Res* 1997 38: 45–54.
33. Links M, Lewis C.. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficiency. *Drugs* 1999 57: 293–308.
34. Lorente CA, Song BZ, Donoff RB. Healing of bony defects in the irradiated and unirradiated rat mandible. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992 Dec;50(12):1305-9.
35. Manzi F. R. 2001. Estudo do efeito radioprotetor da vitamina E (dl-alfa-tocoferil) na reparação tecidual em ratos. 21-115
36. Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987 Oct;64(4):379-90.
37. Marx RE, Johnson RP, Kline SN. Prevention of osteoradionecrosis: a randomized prospective clinical trial of hyperbaric oxygen versus penicillin. *J Am Dent Assoc*. 1985 Jul;111(1):49-54.
38. 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: 827–831.
39. Maxymiw WG, Wood RE, Liu FF. Postradiation dental extractions without hyperbaric oxygen. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 Sep;72(3):270-4.
40. Michalani G. Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo: Pedagógica e Universitária; 1980.
41. Miko S, Yanai T, Hasegawa H, *et al*. Concentration of metallothioneine in mice livers after small dose of irradiation. *J Radiat Res* 1998 39: 239–242.
42. Molteni A, Moulder JE, Cohen EF, Ward WF, Fish BL, Taylor JM, Wolfe LF, Brizio-Molteni L, Veno P.. 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.

43. 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.
44. Morrish RB Jr, Chan E, Silverman S Jr, Meyer J, Fu KK, Greenspan D. Osteonecrosis in patients irradiated for head and neck carcinoma. *Cancer*. 1981 Apr 15;47(8):1980-3.
45. 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: 307–315.
46. Oh HK, Chambers MS, Garden AS, Wong PF, Martin JW. Risk of osteoradionecrosis after extraction of impacted third molars in irradiated head and neck cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Feb;62(2):139-44.
47. Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A; 2000. 3° ed. p.57-67.
48. Rajendran J, Gopal A, Durack L, Fisher D, Press O, Eary J. Comparison of radiation dose estimation for myeloablative radioimmunotherapy for relapsed or recurrent mantle cell lymphoma using (131)I tositumomab to that of other types of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Biother Radiopharm*. 2004 Dec;19(6):738-45.
49. 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: 368–372.
50. Raveli DB, Ferreira BA, Cordeiro Rde C, Okamoto T, Gabrielli MF. The effect of radiation on the chronology of extraction wound healing. Histomorphologic study in rats. *Rev Odontol Univ Sao Paulo*. 1990 Apr-Jun;4(2):119-25.

51. Regezi, J. A.; Courtney, R. M.; Kerr, D. A. Dental management of patients irradiated for oral cancer. *Cancer*, Philadelphia, v. 38, n. 2, p. 994-100, Aug. 1976.
52. Reuther T, Schuster T, Mende U, Kübler A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients--a report of a thirty year retrospective review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Jun;32(3):289-95.
53. Riehl T, Cohen S, Tessner T, Scholemann S, Stenson WS.. Lipopolysaccharide is radioprotective in mouse intestine through a prostaglandin mediated mechanism. *Gastroenterology* 2000 118: 1106–1116.
54. Robbins KT, Harris J Jr, Zaluzec D, Jahrsdoerfer R. Radiological evaluation of mid-third facial fractures. *J Otolaryngol*. 1986 Dec;15(6):366-72.
55. Starcke EN, Shannon IL. How critical is the interval between extractions and irradiation in patients with head and neck malignancy? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977 Mar;43(3):333-7.
56. 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 Oct;61(10):1123-31.
57. Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: Clinical characteristics and relation to the field 2000; 58:1088-93 of irradiation, *J Oral Maxillofac Surg*.
58. Tong AC, Leung AC, Cheng JC, Sham J. Incidence of complicated healing and osteoradionecrosis following tooth extraction in patients receiving radiotherapy for treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Aust Dent J*. 1999 Sep;44(3):187-94.
59. 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.
60. Vudiniabola S, Pirone C, Williamson J, Goss AN. Hyperbaric oxygen in the prevention of osteoradionecrosis of the jaws. *Aust Dent J*. 1999 Dec;44(4):243-7.

61. 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.
62. Weiss JF.. Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. *Environ Health Perspect* 1997 105 (Suppl 6): 1473–1478.
63. 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

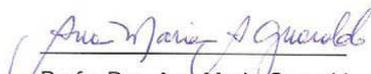
CERTIFICADO

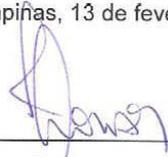
Certificamos que o Protocolo nº 1434-1, sobre "Efeito da homeopatia e fitoterapia sobre parâmetros morfológicos em alvéolo e glândulas salivares de ratos irradiados. Estudo morfológico e morfométrico", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Letícia Rodrigues Nery, está de acordo 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 phytoterapic 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
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

*Recibido
18/02/08
[Signature]*