

Fabiana Vieira Vier - Pelisser

**EFEITO DA TELETERRAPIA FRACIONADA EM POLPA
DENTÁRIA DE RATOS - ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA E
ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

Tese apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Doutor pelo
Programa de Doutorado em
Estomatologia Clínica da Faculdade de
Odontologia da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo

Co-orientador: Dr. José Antonio Poli de Figueiredo

Porto Alegre

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dedico este trabalho à filha **Amanda que carrego no ventre** e às pessoas que acreditam e que embasam suas vidas no amor, meu marido **Audrei** e meus pais **João Flávio e Janete**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e do Espírito Santo.

À minha mãe **Janete Vieira Vier**, pela doação “full time”, durante as sessões de radioterapia dos modelos animais, na fabricação das “garrafinhas” para a contenção dos mesmos, pelas idas e vindas às bibliotecas à procura de artigos científicos, pelas correções do texto da tese, enfim, pelo apoio incondicional, por acreditar em mim e me fazer sentir capaz, encorajando-me a prosseguir sempre.

Ao meu pai **João Flávio Vier**, pelo exemplo profissional, por ter me iniciado na Odontologia, já aos 8 anos de idade, quando me convidava para ajudá-lo em seu consultório.

Ao meu esposo **Audrei Pelisser**, minha fortaleza, meu porto seguro, por seu amor. Ao teu lado, minha felicidade é completa e minha vida tem sentido. Obrigada pela ajuda na perfusão dos animais e pelas inúmeras pesquisas na Internet.

Aos meus orientadores e amigos **Prof^a. Dr^a. Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo** e **Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo** que, muito além de mestres e educadores, são incentivadores e sempre presentes na construção do conhecimento. São seres especiais e iluminados porque não precisam ensinar com aulas ou seminários. Suas vidas e experiências são exemplos que deveriam nortear a vida de todos os pesquisadores. “Fig”! Um dia, eu ainda na especialização, tu comentaste comigo que a pesquisa é uma cachaça. É!!! Hoje eu acredito em ti e agradeço por teres me apresentado a esta bebida. “Toninha”! O teu maior ensinamento para mim foi o de saber separar o trabalho, a pesquisa, o lazer e os momentos em família. Estabelecer as prioridades e a hora de cada uma dessas coisas em nosso dia a dia é a chave para sermos mulheres pesquisadoras, professoras, mães e esposas. Obrigada!

Ao **Programa de Doutorado em Estomatologia Clínica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)**, em especial e carinhosamente às **Profas. Dra. Liliane Soares Yurgel, Dra. Karen Cherubini e Dra. Maria Antonieta Lopes de Souza**, pela coragem e desprendimento com que carregam e defendem este Curso.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela bolsa de estudos que oportunizou esse Curso de Doutorado.

Ao **Serviço de Radioterapia da PUCRS (SERP)**, especialmente ao **Dr. Aroldo Braga Filho**, que disponibilizou as dependências e o pessoal desse Serviço para a execução desta pesquisa.

À Física Médica **Janaína Carlos**, pelo auxílio nos cálculos matemáticos dos tempos diários de radioterapia.

Aos funcionários do turno da noite do SERP: **Dr. Günter Alex Schneider, Carla Rodrigues, Ludância Fiorenza, Giovana Monteiro, Karen de Oliveira, Lauveni Rech, Rosângela Santos, Cláudia Raubach e Luís Zanella**, pela disponibilidade, interesse e atenção.

Ao **Dr. Cláudio Mottin** e ao **Dr. Jefferson Luis Braga Silva**, por terem cedido uma sala para o alojamento dos animais, adjacente ao Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Ao **Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)**, especialmente a **Sra. Geni Fernandes da Silva, Sr. Ernani da Rosa Carmona e Márcio Aristeu Bartochak Makewitz**.

À colega e amiga **Dra. Gabriela Botelho Martins**, a minha mãe **Janete Vieira Vier**, à minha irmã **Júlia Graziela Vieira Vier** e aos alunos da graduação do Curso de Odontologia da PUCRS, **Fernanda Bortoncello e Eduardo Py Flores**, pela ajuda nos dias intermináveis de radioterapia.

Ao **Laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Ciências Médicas (DCM) do ICBS da UFRGS**, na pessoa do **Prof. Dr. Felipe Luis Schneider** e, de maneira especial, ao **Sr. Antonio Generoso Severino**, pelo auxílio na perfusão dos animais.

Ao **Biotério da PUCRS**, na pessoa da coordenadora **Clarice Prade** e funcionários **Mário César e Waldir**, pela instrução quanto aos cuidados para com os animais e pelas tantas vezes que lavaram e carregaram as gaiolas dos mesmos.

Ao **Prof. Dr. Emílio Jeckel**, pela disponibilização do microscópio Olympus AX 70 e do Programa Image-Pro Plus® (versão 4.0), nas dependências do **Laboratório de Envelhecimento Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS e do Laboratório de Histologia da PUCRS**.

À **Raquel Dolphin**, pelo auxílio na descalcificação dos espécimes.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálises (CMM) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA)**, nas pessoas do **Prof. Dr. José Rafael Rosito Coiro, Prof. Dra. Ester Schmidt Rieder** e das biólogas e técnicas **Ana Helena Brittes e Maina Bonetti**, pela amizade, ensinamentos e horas de convívio. À **Manuela Silva de Queiroz**, pelo auxílio no escaneamento e trabalho dispendido nas eletromicrografias.

À **Célia Maria Lemes Silva**, pelo auxílio na preparação das lâminas histológicas.

À **Prof. Dra. Vânia Regina Camargo Fontanella**, pelo tempo e carinho despendidos na manipulação das imagens coradas em Picrossírius, no Programa Adobe Photoshop.

Ao **Prof. Dr. Ramachadan Nair**, pelas considerações feitas sobre as imagens evidenciadas nas eletromicrografias.

Aos meus colegas de curso, **Maria Ivete, Flaviana, Sandra, João Guilherme e José**, pela amizade, aprendizado e discussões em grupo. Um dia viraremos essa página de nossas vidas. Mas, quando olharmos para trás, ficará a saudade desse tempo...

Aos colegas e amigos endodônticos, **Prof. Dr. Fernando Branco Barletta, Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo e Prof. Dr. Marcus Vinicius Reis Só** por acreditarem em mim e torcerem para que esse dia chegasse. Obrigada pelas oportunidades de trabalho, pelo carinho e pelo exemplo de amizade.

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira como respondemos a ele. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas: só nos obriga a sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditamos no nosso sonho, nada é por acaso.”

Henfil

RESUMO

O tratamento de neoplasias malignas epiteliais na região de cabeça e pescoço é usualmente realizado mediante a cirurgia e/ou radioterapia. O efeito da teleterapia fracionada no tecido pulpar é um tema pouco estudado na literatura. As alterações pulpares oriundas da terapia radioativa deveriam ser pesquisadas, no intuito de serem prevenidas ou precocemente tratadas, minimizando as chances do paciente irradiado desenvolver a osteorradionecrose. Este estudo avaliou o efeito imediato e tardio (30 dias) da teleterapia fracionada por cobalto-60 no tecido pulpar de ratos. Estes eram albinos (n=45) de espécie, idade e peso semelhantes, sendo divididos em quatro grupos: grupo 1 – (n=15) submetidos à teleterapia fracionada (60 Gy) e eutanasiados terminada a última dose de irradiação; grupo 2 – idêntico ao grupo 1, porém mortos 30 dias após a conclusão da teleterapia; grupos 3 (n=7) e 4 (n=8), não irradiados, servindo como grupos-controle para os grupos experimentais 1 e 2, respectivamente. O protocolo radioterápico consistiu de 30 sessões de teleterapia na região da cabeça, fracionadas em doses de 200 cGy/dia, totalizando 60 Gy. Após a perfusão dos animais, a hemimandíbula esquerda foi dissecada e processada histologicamente. Secções seriadas (5µm) foram obtidas e coradas com HE e Picrossírius. Um observador cegado avaliou a polpa coronária dos molares nas lâminas coradas com HE, empregando índices pré-definidos de inflamação, alteração nuclear e hialinização da matriz. O percentual médio de colágeno foi mensurado nas imagens das secções coradas com Picrossírius, convertidas para preto e branco, valendo-se do Programa Image-Pro Plus. As alterações nucleares foram ainda analisadas de forma descritiva, através da MET, em fibroblastos pulpares de incisivos inferiores. Analisaram-se 10 fibroblastos de cada grupo, em magnificações de 6300 e 10000X. A teleterapia fracionada por Co⁶⁰, na dose

estabelecida, não foi capaz de provocar processo inflamatório, hialinização da matriz ($P = 0,428$) ou mudança no percentual médio de colágeno ($P = 0,067$). Os grupos 1 e 2 apresentaram alterações nucleares em fibroblastos e odontoblastos pulparest estatisticamente superiores ($P < 0,05$), em relação aos grupos-controle. O aspecto bolhoso pareceu mais pronunciado no grupo 1 do que no grupo 2. Através da MET, os fibroblastos pulparest do grupo 1 demonstraram alterações nucleares semelhantes a perfurações circulares, ovais ou alongadas. Essas estavam presentes também no citoplasma, sendo este aspecto observado exclusivamente no grupo 1. Concluiu-se que a teleterapia fracionada é capaz de produzir alterações nucleares nas células de polpas dentárias de ratos.

Palavras-chave: teleterapia por radioisótopo, ratos, cabeça, dente, polpa dentária, microscopia

ABSTRACT

Treatment of head and neck epithelial malignant neoplasia is generally conducted with surgery or radiotherapy. There is little literature regarding the effect of fractionated teletherapy on dental pulp tissues. The pulp alterations from radioactive therapy should be studied, to prevent or treat in an early stage, minimizing the possibilities of side effects such as osteoradionecrosis. This study aimed to analyse the early and late (30 days) effects of fractionated teletherapy on rat dental pulps using Co⁶⁰. Albino rats (n=45) characterized by species, age and weight were divided into four groups. Group 1 – rats (n=15) were submitted to fractionated teletherapy (60 Gy) and killed immediately after the last irradiation dose; Group 2 – same as Group 1 but killed 30 days following the last irradiation dose; Groups 3 (n=7) and 4 (n=8) formed controls without irradiation for groups 1 and 2, respectively. The radiotherapy protocol consisted of 30 sessions of head teletherapy, fractionated in doses of 200 cGy/day, totaling 60 Gy. Following perfusion, the left mandible was dissected and processed for histopathology. Serial sections (5 µm) were obtained and stained with HE and picrossyrius. Observations were recorded for the molar coronal pulps. A blinded observer evaluated the HE sections using pre-defined indices of inflammation, nuclear alterations, and ECM hyalinization. Images of sections stained with picrossyrius were converted to black and white for analysis by Image-Pro Plus. The collagen content (areas in black) was measured as % area. The pulps of the lower incisors of the specimens prepared for TEM were object to descriptive analysis. Magnifications of 6300 and 10000x were used to observe 10 pulp fibroblasts from each group. No inflammatory reactions or modification of the ECM hyalinization status were found (P = 0.428). The collagen content also displayed no significant changes (P = 0.067). Groups 1 and 2 displayed significantly more nuclear alterations

than the control groups ($P < 0.05$). The bubble-like aspect was more pronounced in Group 1, and the bubbles looked smaller in Group 2. Under TEM, the pulp fibroblasts in Group 1 showed nuclear alterations that resembled perforations that appeared circular, oval or elongated; perforations also appeared in the cytoplasm. This feature could only be found in Group 1. It could be concluded that fractionated teletherapy is capable of producing nuclear alterations in rat dental pulps.

Keywords: radioisotope teletherapy, rats, head, tooth, dental pulp, microscopy

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** a. Animais dispostos em gaiolas; b. contenção plástica; c. animais no interior da contenção; d. aparelho de radioterapia; e. dispositivo com canaletas para apreensão das contenções; f. animais posicionados no campo de radiação. 57
- Figura 2 -** a. Incisão no ventre do animal; b. diafragma excisado; c. corte de relaxamento nas costelas; d. aplicação de heparina no coração; e. pinçamento da aorta abdominal descendente; f. fio de sutura circundando a aorta ascendente; g. catéter venoso central no ventrículo esquerdo; h. nó duplo na aorta ascendente; i. incisão no átrio direito. 60
- Figura 3 -** Hemimandíbula de rato. O fragmento delimitado pelas linhas pretas foi destinado à MO, nos animais perfundidos com paraformaldeído a 4%. Esse fragmento foi ainda dividido (linha vermelha) em duas porções: superior, destinado à MO, e inferior, destinado à MET, nos espécimes perfundidos com glutaraldeído a 2%. 61
- Figura 4 -** a, b. Imagens de um espécime coradas com Picrossírius, onde três áreas retangulares foram delimitadas para análise. 65
- Figura 5 -** a. Imagem demonstrando a seqüência para substituição das cores, exceto do vermelho, por branco; b,c. Substituição da cor de fundo da imagem (b) e do núcleo das células (c) por branco; d. Aplicação da luminosidade igual a 100; e. Inversão da cor vermelha pela preta; f. Imagem final, contendo as cores preto e branco, sendo o preto a área correspondente ao colágeno. 67
- Figura 6 -** Aspecto clínico de animal do grupo 2 demonstrando acentuada epilação na região da cabeça. 74
- Figura 7 -** Fotomicrografia mostrando polpa coronária de animal do grupo 1, com ausência de processo inflamatório, alteração nuclear grau 3, ocupando grande parte de sua área. HE. Aumento: 400X. 76
- Figura 8 -** Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1. As setas verdes demonstram a presença de alteração nuclear nos odontoblastos e, as azuis, nos fibroblastos pulpares. Observar a formação de osteodentina (I). HE. Aumento: 400 X. 77
- Figura 9 -** Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1. A região em destaque revela a presença de alteração nuclear expressiva nas células, assemelhando-se a extensos vacúolos ou bolhas. HE. Aumento: 400 X. 77

Figura 10 -	Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 2. As regiões em destaque apresentam células com alterações nucleares discretas, assemelhando-se a diminutos vacúolos ou bolhas. HE. Aumento: 400 X.	78
Figura 11 -	Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 4. Observar a ausência de alteração nuclear e a presença de núcleos palidamente corados. HE. Aumento: 400 X.	78
Figura 12 -	Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1. Observar a extensa hialinização da matriz (I). HE. Aumento: 40X.	80
Figura 13 -	Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 2, exibindo evidente hialinização da matriz. HE. Aumento: 400 X. .	81
Figura 14 -	Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1, apresentando áreas focais (I) de hialinização da matriz. HE. Aumento: 400X.	81
Figura 15 -	Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1 exibindo a presença de formação de osteodentina (I). As setas demonstram odontoblastos aprisionados na matriz orgânica de dentina. HE. Aumento: 400 X.	82
Figura 16 -	Eletromicrografia de fibroblastos pulpares do grupo 1 apresentando alterações nucleares e citoplasmáticas, assemelhando-se a perfurações circulares (I), ovóides ou alongadas (H). Notar a extensa condensação da cromatina na periferia do núcleo (setas). Aumento: a, c - 6300 X; b - 10000 X.	85
Figura 17 -	Eletromicrografia de fibroblastos do grupo 2 demonstrando ausência de alterações nucleares e citoplasmáticas. Aumento: a, b - 6300 X; c - 10000 X.	86
Figura 18 -	Eletromicrografia de fibroblastos do grupo 3 demonstrando ausência de alterações nucleares e citoplasmáticas. Notar a presença de feixes transversais de fibras colágenas nos fibroblastos do grupo-controle (setas). Aumento: 6300 X.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Peso médio (g) inicial e final dos animais dos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.	73
Tabela 2 -	Presença e extensão de alteração nuclear em polpas coronárias de molares de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.	75
Tabela 3 -	Níveis de hialinização da matriz em polpas coronárias de molares de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.	80
Tabela 4 -	Percentual médio de colágeno em polpas coronárias de molares de ratos coradas com Picrossírius, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.	82
Tabela 5 -	Tabela da Análise de Variância do percentual médio de colágeno em polpas coronárias de molares de ratos coradas com Picrossírius. Porto Alegre, 2005.	83

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Peso (g) inicial dos animais dos grupos experimentais e controles.	124
Apêndice B -	Peso (g) final dos animais dos grupos experimentais e controles.	124
Apêndice C -	Seqüência da pré-embebição dos espécimes pulpares, em resina epóxi EPON 812 e acetona pura.	125
Apêndice D -	Classificação das lâminas histológicas coradas com HE, quanto à presença e ausência de processo inflamatório em polpa coronária de molares de ratos, nos grupos experimentais e controles.	125
Apêndice E -	Grau de concordância intra-observador entre a primeira e a segunda avaliação, quanto à presença e extensão de alteração nuclear em polpas coronárias de molares de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.	126
Apêndice F -	Classificação das lâminas histológicas coradas com HE, quanto à presença e extensão de alteração nuclear em polpa coronária de molares de ratos, nos grupos experimentais e controles.	126
Apêndice G -	Classificação das lâminas histológicas coradas com HE, quanto à presença e extensão de hialinização da matriz em polpa coronária de molares de ratos, nos grupos experimentais e controles.	127
Apêndice H -	Grau de concordância intra-observador entre a primeira e a segunda avaliação, quanto à presença e extensão de hialinização da matriz em polpas coronárias de molares de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.	128
Apêndice I -	Percentual médio de colágeno por amostra, em polpa coronária de molares de ratos, das lâminas histológicas coradas com Picrossírius, nos grupos experimentais e controles.	128

ANEXO

Anexo A -	Aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.	131
------------------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – grau Celsius

Co⁶⁰ – cobalto-60

CG – Complexo de Golgi

cGy – centigray, equivalente à centésima parte do gray, unidade de medida de radiação ionizante

cm – centímetro

CMI – células mesenquimais indiferenciadas

CMM – Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálises

DCM – Departamento de Ciências Médicas

DNA – ácido desoxirribonucléico

dpi – “dots per inch”, pontos por polegada

ECM – extracellular matrix

EDTA – ácido etileno-diamino-tetracético

g – gramas

Gy – gray, unidade de dose absorvida durante uma emissão de raios ionizantes e que significa a energia depositada por unidade de massa, correspondente a 100 rads (1 joule por quilograma).

HE – Hematoxilina de Harris e Eosina alcoólica

kg – quilograma

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IPB – Instituto de Pesquisas Biomédicas

keV – quiloelétron-volt

kV – quilovolt

M – solução molar, relativo a mol

MC – membrana citoplasmática

mg – miligrama

ml – mililitro

mm³ – milímetro cúbico

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MeV – megaelétron-volt, um milhão de elétron-volt

MO – microscopia óptica

μm – micrômetro

μm² – micrômetro quadrado

nm – nanômetro

pH – Potencial de Hidrogênio, representação da escala na qual uma solução neutra é igual a 7.

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SERP – Serviço de Radioterapia da PUCRS

RER – retículo endoplasmático rugoso

RNA – ácido ribonucléico

RS – Rio Grande do Sul

TEM – Transmission Electron Microscopy

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UI – Unidades Internacionais

ULBRA – Universidade Luterana do Brasil

²³⁶Ra – rádio 236

²³⁹Pu – plutônio 239

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	POLPA DENTAL	24
2.2	O EMPREGO DA IRRADIAÇÃO NO TRATAMENTO DO CÂNCER NA REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO	31
2.3	EFEITO DA IRRADIAÇÃO SOBRE O TECIDO PULPAR E ESTRUTURAS ADJACENTES EM DENTES COMPLETAMENTE FORMADOS	38
3	PROPOSIÇÃO	49
3.1	OBJETIVOS	50
3.1.1	<i>Geral</i>	50
3.1.2	<i>Específicos</i>	50
3.2	HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	DELINEAMENTO	53
4.2	LINHA DE PESQUISA	53
4.3	VARIÁVEIS	53
4.3.1	<i>Dependentes</i>	53
4.3.2	<i>Independentes</i>	53
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	53
4.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS	54
4.6	PROCEDIMENTOS	54
4.6.1	<i>Manutenção dos modelos animais</i>	54
4.6.2	<i>Protocolo de radioterapia</i>	55
4.6.3	<i>Eutanásia dos animais</i>	56
4.6.4	<i>Preparo e avaliação histológica dos espécimes por microscopia óptica</i>	61
4.6.4.1	<i>Avaliação dos espécimes corados com HE</i>	63
4.6.4.2	<i>Avaliação morfométrica dos espécimes corados com</i>	

	Picrossírius	65
4.6.5	<i>Preparo e avaliação histológica dos espécimes em MET</i>	68
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	70
5	RESULTADOS	72
5.1	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ESPÉCIMES	74
5.1.1	<i>Avaliação dos espécimes corados com HE</i>	74
5.1.1.1	Processo inflamatório	74
5.1.1.2	Alteração nuclear	75
5.1.1.3	Hialinização da Matriz	79
5.1.2	<i>Avaliação morfométrica dos espécimes corados com Picrossírius</i>	82
5.2	AVALIAÇÃO DOS ESPÉCIMES EM MET	83
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICES	123
	ANEXO	130

1 INTRODUÇÃO

A radioterapia é uma das modalidades que podem ser utilizadas para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço (SILVA; ARRUDA, 2004). Ela emprega as radiações ionizantes com o objetivo de destruir as células neoplásicas visando à redução ou ao desaparecimento da lesão maligna (LIMA et al., 2001).

Além dos efeitos terapêuticos da radiação, existem complicações específicas que podem advir da sua utilização nesta região, como por exemplo, cárie e mucosite radio-induzidas, candidíase, osteorradionecrose, xerostomia, limitação do grau de abertura bucal, diminuição da qualidade da função mastigatória, disgeusia e tolerância diminuída ao uso de próteses totais muco-suportadas (SILVERMAN JR; CHIERICI, 1965; BEUMER III; BRADY, 1978; BROWN; MILLER; BOTTOMLEY, 1990; DE MOOR, 2000; SEGRETO; SEGRETO, 2000).

Apesar de inúmeras publicações mencionarem o efeito da radioterapia sobre os dentes, no que tange ao seu desenvolvimento e erupção, poucos são os estudos relativos ao efeito da radioterapia no tecido pulpar de dentes completamente formados (KALNINS, 1954; MEYER; SHKLAR; TURNER, 1962, 1966; HUTTON et al., 1974; NICKENS et al., 1977; ANNEROTH; HOLM; KARLSSON, 1985; FAWZI; SHKLAR; KRAKOW, 1985). O dano à polpa foi considerado expressivo quando se empregou a ortovoltagem (KALNINS, 1954; MEYER; SHKLAR; TURNER, 1962, 1966). No entanto, quando se utilizou o cobalto-60 (Co^{60}) em macacos, Hutton et al. (1974), Nickens et al. (1977), Matson et al. (1978) e Fawzi; Shklar; Krakow (1985) não encontraram alterações patológicas discerníveis entre polpas irradiadas e as do grupo-controle, apesar de Anneroth; Holm; Karlsson (1985) terem demonstrado transformação metaplásica, na forma de fibrose e hialinização, em polpas de pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço.

As alterações oriundas da ação da radiação ionizante no tecido pulpar de dentes completamente formados, que oportunizem ou propiciem a necrose pulpar e, conseqüentemente, a infecção do sistema de canais radiculares devem ser estudadas, na tentativa de preveni-las ou tratá-las o mais precocemente possível; evitando que o paciente irradiado tenha um risco aumentado para o desenvolvimento da osteorradiocrose, que é considerada a mais grave complicação da radioterapia quando utilizada no tratamento do câncer da região de cabeça e pescoço (DE MOOR, 2000).

Assim, baseado nas informações supracitadas e motivando o desenvolvimento deste estudo, questiona-se a capacidade da teleterapia fracionada na região da cabeça ser capaz de promover efeitos deletérios imediatos e/ou tardios no tecido pulpar de dentes de ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 POLPA DENTAL

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo especializado, ricamente vascularizado, de origem mesenquimal, localizado no interior da dentina (SOUZA, 1999), que exerce funções de formação, nutrição, defesa e sensorial (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988). É constituída por células, substância fundamental, fibras, vasos sangüíneos e linfáticos e nervos (CARVALHO; FIGUEIREDO, 1999). A polpa ocupa a porção central do dente, denominado de espaço pulpar, dividido em porção coronária (câmara pulpar) e radicular (canal radicular) (TORNECK, 2001). Assim, o tecido pulpar exhibe condições fisiológicas e anatômicas únicas, visto que é limitado por tecido duro. Quando um estímulo inflamatório afeta a polpa, sua função e vitalidade podem ser comprometidas, provavelmente devido a distúrbios circulatórios (OKAMURA et al., 1994).

Quando o aspecto histológico da polpa é examinado, zonas distintas podem ser distinguidas da pré-dentina em direção ao âmago do tecido: a camada odontoblástica, responsável pela elaboração da matriz orgânica de dentina; a camada acelular de Weil, proeminente na polpa coronária, com poucas células e intensa rede vascular e nervosa; a camada rica em células e o centro da polpa, caracterizado por vasos e nervos maiores do tecido (LYROUDIA et al., 1994; CARVALHO; FIGUEIREDO, 1999; TORNECK, 2001).

As principais células da polpa são os odontoblastos, os fibroblastos, as células mesenquimais indiferenciadas (CMI) e as células imunocompetentes (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988; TORNECK, 2001).

O odontoblasto é uma célula altamente diferenciada da polpa dental. Localiza-se no limite entre a polpa e a dentina, de tal forma, que o corpo celular encontra-se no tecido pulpar e o prolongamento citoplasmático apical continua no interior da

dentina (SÁNCHEZ-OSORIO et al., 1988). Dessa forma, os odontoblastos são células polarizadas, altas e colunares que delimitam a superfície pulpar. O núcleo é situado na posição basal, separando a região infranuclear da supranuclear. A primeira possui poucas organelas e a segunda contém perfis abundantes de retículo endoplasmático rugoso (RER) e de Complexo de Golgi (CG). No processo odontoblástico encontra-se o maior sítio de secreção de colágeno dessas células (WEINSTOCK; LEBLOND, 1974).

Na porção coronária do dente maduro, os odontoblastos freqüentemente parecem dispostos em paliçada, apresentando três a cinco células de profundidade. Tal arranjo é um artefato causado pela aglomeração dessas células, conforme migram centripetamente (TORNECK, 2001). A forma e arranjo dos odontoblastos não são uniformes em toda a extensão da polpa. São colunares na câmara pulpar, cubóides nos terços cervical e médio da raiz e achatados em apical (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988).

A morfologia dos odontoblastos reflete a sua atividade funcional. Varia de uma fase ativa de síntese de matriz orgânica de dentina a uma de repouso. Pela microscopia óptica (MO), uma célula ativa pode ser observada apresentando núcleo evidente, citoplasma basofílico e CG proeminente. Já a célula em repouso é achatada, com citoplasma relativamente escasso e núcleo mais corado pela hematoxilina (TORNECK, 2001).

Sánchez-Osorio (1978) estudou os odontoblastos, os fibroblastos e a neuroarquitetura em segmentos pulpares coronários de dentes humanos extraídos, por razões cirúrgicas e/ou ortodônticas, valendo-se da microscopia eletrônica de transmissão (MET). O núcleo dos odontoblastos adultos, localizado no pólo basal da célula, apresentava-se volumoso e com condensação da cromatina na periferia. Na

superfície externa da membrana nuclear foi possível distinguir alguns ribossomos. O CG foi observado no centro celular, sendo constituído por um sistema laminar de paredes lisas e microvesículas. O RER mostrou um aumento da largura de suas cisternas, cujo conteúdo era um material finamente granular. Na superfície externa das mesmas, poucos ribossomos foram identificados. Mitocôndrias com diferentes formas fizeram-se presentes, predominando as arredondadas, com matriz moderadamente eletrodensa. Uma característica constante dos odontoblastos adultos constituiu-se na presença de grandes vacúolos citoplasmáticos limitados por uma membrana, com conteúdo finamente granular. Para os autores, as observações ultraestruturais detectadas nesta célula indicam pouca atividade funcional. No entanto, quando for estimulada externamente, a mesma apresenta capacidade de reiniciar a síntese de dentina. Já os fibroblastos foram as células mais abundantes e estavam irregularmente distribuídas na substância intercelular da polpa, rodeadas por numerosos feixes de fibras colágenas. Possuíam prolongamentos citoplasmáticos grandes e afilados nas extremidades, conferindo um aspecto fusiforme à célula. O núcleo do fibroblasto, localizado centralmente, era ovalado, com a cromatina condensada na periferia. As mitocôndrias eram irregularmente distribuídas no citoplasma e o RER era escasso, indicando pouca atividade de síntese protéica.

Os fibroblastos são as células mais numerosas da polpa, distribuindo-se em todo tecido, com exceção da zona acelular subjacente aos odontoblastos (SOUZA, 1999). A função dos fibroblastos na polpa é formar e manter a matriz pulpar, que consiste em colágeno e substância fundamental (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988; TORNECK, 2001). Assim, essas células sintetizam moléculas extracelulares tais como colágenos, elastinas, proteoglicanos e glicoproteínas (TEN CATE, 2001).

Existem fibroblastos funcionalmente ativos e inativos (SOUZA, 1999), sendo que os primeiros apresentam forma fusiforme bipolar, com citoplasma relativamente abundante e núcleo oval, enquanto os segundos exibem núcleos menores e escasso citoplasma (MURRAY et al., 2002). Nas polpas jovens, tais células sintetizam ativamente a matriz e, por isso, possuem citoplasma contendo grandes quantidades de organelas de síntese e secreção, bem como o núcleo evidente (TORNECK, 2001). As células jovens caracterizam-se pela presença de RER, mitocôndrias, CG, extensos prolongamentos citoplasmáticos e núcleos com cromatina frouxa. Na polpa adulta, as necessidades de síntese tornam-se menores e alguns fibroblastos transformam-se em fibrócitos, que são células fusiformes, apresentando núcleos com cromatina condensada, curtos prolongamentos citoplasmáticos e poucas organelas (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988; TORNECK, 2001). Quando devidamente estimulados, eles também são capazes de ingerir e degradar o colágeno. A morte apoptótica destas células indica que alguma renovação ocorre com as mesmas (TORNECK, 2001). Os fibroblastos são normalmente reconhecidos ao microscópio óptico pela sua associação com feixes de fibras colágenas. Em repouso, apresentam núcleo achatado, de coloração escura e pouco citoplasma. O fibroblasto ativo possui núcleo maior, palidamente corado e com grande quantidade de citoplasma. Ao microscópio eletrônico, os fibroblastos ativos apresentam o complemento usual das organelas citoplasmáticas, porém mais numerosas. Há um grande número de cisternas de CG, muitos perfis de RER, mitocôndrias e vesículas secretoras, indicando funções de síntese e secreção celular (TEN CATE, 2001).

Griffin; Harris (1966) analisaram, em MET, fibroblastos de polpas de dentes não erupcionados, com rizogênese incompleta, extraídos por razões ortodônticas, em áreas onde a síntese ativa de colágeno estava ocorrendo. Os autores

observaram RER, na forma de cisternas dilatadas, amplas mitocôndrias com cristas irregulares e condensação marginal de corpos densos amorfos ocasionais, possivelmente lisossomos, que foram identificados próximos à membrana citoplasmática (MC). Extensos CG foram vistos nas adjacências do núcleo. Foram percebidas, ao lado do CG, por todo o citoplasma e perto ou unido à MC, estruturas vesiculares, possivelmente secretoras, contendo material amorfo.

As CMI constituem um reservatório de células pulpares de reposição, as quais, mais tarde, podem substituir os odontoblastos necróticos ou assumir funções de defesa (SOUZA, 1999). São encontradas na área rica em células, assim como no centro da polpa e, freqüentemente, relacionam-se com os vasos sanguíneos. À MO, elas aparecem como grandes células poliédricas com núcleo central volumoso e levemente corado. Exibem abundante citoplasma e extensões citoplasmáticas periféricas. Em polpas senis, o número de CMI diminui. Tal redução, associada a outros fatores de envelhecimento, diminui o potencial regenerativo da polpa (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988; TORNECK, 2001). Os linfócitos T são encontrados nas polpas normais, porém os linfócitos B estão ausentes (TORNECK, 2001).

As células de defesa, tais como os histiócitos (macrófagos fixos), os monócitos e os linfócitos, desempenham papel importante na reação inflamatória pulpar (SOUZA, 1999).

O compartimento extracelular da polpa, ou matriz, consiste em fibras colágenas, principalmente dos tipos I e III, e substância fundamental, composta de glicosaminoglicanos, glicoproteínas e água (TORNECK, 2001). Geralmente, as fibras colágenas arranjam-se em feixes que correm em diferentes direções, sendo raramente vistas como fibras isoladas (LYROUDIA et al., 1994). Quando jovem, a polpa é rica em substância intercelular amorfa e pobre em fibras colágenas. Com o

passar do tempo, o tecido modifica-se ocorrendo um maior arranjo de fibras colágenas distribuídas em feixes mais calibrosos e concentradas na região apical (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988).

Os diferentes tipos de colágeno são compostos de três cadeias polipeptídicas alfa enroladas, para formar a configuração típica em tripla hélice. As características comuns são uma composição de aminoácidos com alta proporção de glicina, hidroxiprolina e hidroxilisina (TEN CATE, 2001).

A coloração histoquímica denominada Picrossírius, que emprega o corante sírius vermelho, é um método simples, específico e seletivo para a localização e a quantificação do colágeno. Essa reação é possível porque o colágeno é uma proteína básica, permitindo a reação dos seus grupos amina dos aminoácidos lisina e hidroxilisina, com os grupamentos ácidos do corante, em pH próximo de 2 (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

Os vasos sangüíneos entram e deixam a polpa dentária através dos forames apical e acessórios. As arteríolas ocupam uma posição central na polpa, atravessam sua porção radicular e emitem pequenos ramos laterais que se estendem e ramificam em direção à área subodontoblástica. Na região coronária da polpa forma-se uma extensa rede vascular capilar. O lado eferente ou de drenagem da circulação é composto por um extenso sistema de vênulas de diâmetros comparáveis aos das arteríolas, porém as suas paredes são mais finas, tornando o seu lúmen maior. Os vasos linfáticos também são encontrados no tecido pulpar, sendo estes de pequeno calibre e com paredes finas. Percorrem, apicalmente, as regiões média e radicular da polpa, deixando-a, através de um ou dois grandes vasos, pelo forame apical (TORNECK, 2001). Morfologicamente, as arteríolas são reconhecidas pelo aspecto corrugado do seu lúmen, bem como pela disposição circular dos fibroblastos e das

fibras em sua periferia. Estas características são ausentes nas vênulas, que apresentam um contorno interno liso e perda do arranjo circular de elementos do tecido conjuntivo. No entanto, arteríolas e vênulas, mas principalmente as últimas, apresentam muitas vesículas ou vacúolos citoplasmáticos nas células endoteliais (LYROUDIA et al., 1994).

A polpa dentária é ricamente innervada, havendo uma estreita e constante relação neurovascular, podendo-se dizer que os nervos e os vasos pulpares apresentam o mesmo plano de distribuição. Os nervos localizados nas proximidades dos vasos sanguíneos são constituídos por fibras nervosas mielínicas e amielínicas, ambas envoltas pelo citoplasma das células de Schwann. Um feixe neurovascular penetra na polpa através do forame apical, sendo que, de um feixe nervoso predominantemente mielinizado saem filetes nervosos até a região periférica do órgão pulpar, perdendo sua mielina no decorrer desse trajeto. Este feixe, na região subodontoblástica coronária, constitui o Plexo de Raschkow, localizado na camada acelular de Weil (SÁNCHEZ-OSORIO, 1978; TORNECK, 2001).

Gvozdenovic-Sedlecki; Qvist; Hansen (1973) investigaram, em 54 pré-molares hígidos de pacientes entre 11 e 15 anos de idade, com extração indicada por razões ortodônticas, as variações histológicas do tecido pulpar. Foram avaliadas a pré-dentina, a camada odontoblástica, a zona acelular de Weil, a camada rica em células e a parte central da polpa. As células inflamatórias, fibras colágenas e vasos sanguíneos foram categorizados em: “nenhum”, “poucos”, “moderados” ou “muitos”. O número de fibras colágenas foi consideravelmente menor na porção coronária do que na radicular. “Poucas” e “moderadas” fibras foram identificadas, respectivamente, em 43 e 11 dos espécimes estudados na porção coronária. Na porção radicular, 22, 17 e 3 espécimes foram classificados, respectivamente, como

portadores de “muitas”, “moderadas” e “poucas” fibras colágenas. Houve uma grande variação na espessura da pré-dentina na polpa coronária e praticamente todos os dentes possuíam vacúolos na camada odontoblástica e células inflamatórias na zona rica em células. Por outro lado, na polpa coronária, o número de fileiras de núcleos de odontoblastos foi constante. Além disso, uma zona de Weil imperceptível e atrofia reticular na porção central da polpa foram considerados achados comuns.

A resposta pulpar a diferentes estímulos nocivos depende da intensidade, tempo e frequência do agente irritante, traduzida desde a simples deposição de dentina até modificações de natureza degenerativa ou inflamatória, chegando à supuração ou à necrose pulpar. Esta resposta do tecido está condicionada às condições prévias da polpa, sendo que a cárie dental é considerada a principal causa das lesões pulpares (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988; SIQUEIRA JR; LOPES, 1999; SOARES; GOLDBERG, 2001).

2.2 O EMPREGO DA IRRADIAÇÃO NO TRATAMENTO DO CÂNCER NA REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO

A radioterapia é a modalidade terapêutica que utiliza as radiações ionizantes com o objetivo de destruir as células neoplásicas, visando à redução ou à cura da lesão maligna (LIMA et al., 2001) e à manutenção da vitalidade e da capacidade de reprodução do tecido normal (DEGERING, 1971). Costuma ser utilizada para lesões localizadas e avançadas no câncer de cabeça e pescoço (SILVA; ARRUDA, 2004).

Como resultado do avanço contínuo das técnicas e modalidades usadas na radioterapia, a maioria dos tumores na região de cabeça e pescoço é tratada pela cirurgia ou por sua associação com a radioterapia. A radiação terapêutica é usada

comumente no tratamento dos carcinomas de células escamosas e linfomas. A dose de radiação varia de 40 a 70 Gy, sendo costumeiramente fracionada em doses diárias de aproximadamente 2 Gy, o que permite distribuir, num período de quatro a sete semanas, a dose total recomendada (REGEZI; SCIUBBA, 2000).

A escolha entre a radioterapia, a quimioterapia e a cirurgia, ou a combinação entre elas, é ditada por diversos fatores como idade e saúde do paciente, bem como o tamanho, a localização e o tipo de tumor a ser tratado (SILVERMAN JR; CHIERICI, 1965; BLOZIS; ROBINSON, 1968).

Masella; Cupps; Laney (1972) citaram que a radioterapia pode ser utilizada como método único para tratamento do câncer, ou ainda, ser empregada previamente a cirurgia na tentativa de reduzir o tamanho da lesão, facilitando a excisão da mesma. Pode ser aplicada no pós-cirúrgico, visando ao controle de doença residual. Em alguns casos, a radioterapia é preferida à cirurgia pela possibilidade da preservação funcional do órgão a ser tratado. Para lesões mais avançadas, a radioterapia é mais freqüentemente utilizada como um tratamento adjuvante à cirurgia (SILVA; ARRUDA, 2004).

As indicações habituais para se empregar a radioterapia pós-operatória nos carcinomas da cavidade oral incluem um ou mais dos seguintes achados patológicos relacionados com o sítio primário: a presença de lesões pobremente diferenciadas, invasão óssea, margens cirúrgicas comprometidas, invasão perineural e do espaço vascular, extensão da neoplasia no interior dos tecidos moles do pescoço ou, ainda, multicentricidade (PARSONS et al., 1997).

As radiações ionizantes podem afetar os tecidos de forma direta ou indireta. O efeito direto é exercido sobre componentes celulares como o ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), proteínas e lipídeos. O indireto

é causado pela ionização da água, que resulta na formação de radicais livres, que podem reagir com substâncias biologicamente importantes (MARX; JOHNSON, 1987; HELLMAN, 1997; HALL, 2000; SEGRETO; SEGRETO, 2000; LANGLAND; LANGLAIS, 2002). O DNA é considerado um dos alvos mais importantes para os efeitos citotóxicos da radiação. Entre as alterações radioinduzidas, as quebras duplas do DNA são as mais prejudiciais, podendo levar as células à morte (METTLER JR; UPTON, 1995; SEGRETO; SEGRETO, 2000). Outro efeito importante da irradiação é o dano na membrana celular e no transporte de substâncias pela mesma. A presença de edema costuma ser visualizado com doses moderadas de radiação (HELLMAN, 1997).

Quando as células são irradiadas, apresentam visíveis alterações morfológicas. Em baixas doses, há edema e agrupamento da cromatina no núcleo. Com altas doses, o núcleo torna-se denso e desfigurado, podendo haver edema e perda da membrana nuclear. O citoplasma também pode apresentar edema, distorção das mitocôndrias e degeneração do retículo endoplasmático. Estas mudanças são, provavelmente, decorrentes de processos que ocorrem no interior da célula (METTLER JR; UPTON, 1995). Gajdusek et al. (2001) relataram que células endoteliais aórticas exibem respostas morfológicas, funcionais e fisiológicas distintas quando expostas à radiação ionizante. Doses acima de 2,5 Gy provocam mudanças morfológicas consistentes com apoptose, associadas à perda da viabilidade celular, em períodos de 12 a 16 horas pós-irradiação.

Silverman; Sheline (1961) avaliaram esfregaços de carcinomas da cavidade oral e da mucosa normal adjacente de 40 pacientes tratados com irradiação ionizante, antes da instituição da terapia, durante e após o tratamento. Foram examinadas 100 células aparentemente normais da área da lesão e da mucosa

normal adjacente com relação às seguintes alterações causadas pela irradiação: vacuolação citoplasmática, multinucleação, aumento nuclear e citoplasmático. Não houve diferença significativa na resposta à irradiação entre as células obtidas diretamente da lesão e aquelas da mucosa adjacente. Vacuolação citoplasmática pôde ser percebida tanto em células epiteliais expostas, quanto em não expostas à irradiação. A multinucleação foi raramente visualizada em células normais não irradiadas. O tamanho nuclear e citoplasmático dobrou ou triplicou durante a terapia e foi o achado morfológico mais comum. O aumento nuclear com rugosidades periféricas ou aberrações da cromatina foram alterações pouco freqüentes.

Fonkalsrud et al. (1977) avaliaram, em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as alterações morfológicas agudas e crônicas no endotélio de artérias femurais de cães, submetidos à radiação em uma dose total de 40 Gy, dispensada em dez dias consecutivos de tratamento. Segmentos arteriais obtidos 48 horas após o curso de radiação mostraram extensas mudanças endoteliais, evidenciadas por transtornos nucleares acompanhados pela formação de grandes crateras. Espécimes obtidos na semana subsequente à irradiação mostraram grave interrupção nuclear das células endoteliais. Três semanas pós-irradiação, foi possível evidenciar, de uma maneira semi-ordenada, esporádico repovoamento celular. Poucas células apresentavam o núcleo danificado, uma vez que as crateras foram menos freqüentes do que nos espécimes de 48 horas e uma semana após a radiação. Os espécimes, obtidos seis semanas pós-irradiação, revelaram a presença de discretas células alongadas localizadas esparsamente, que diferiam da célula endotelial normal. Muitas crateras nucleares ainda estavam presentes, apesar da lisura geral da superfície. Aos três e quatro meses pós-irradiação, apesar da progressiva repopulação endotelial por células alongadas discretas com projeções

celulares, a MEV demonstrou a persistência de fragmentos celulares com crateras e pontas irregulares. Pequenas células redondas ocasionais apareceram na superfície, particularmente onde os fragmentos celulares apresentavam-se mais depauperados.

Baker (1982) relatou que os compartimentos celulares em franca mitose são mais sensíveis à radiação do que aqueles que já cessaram essa atividade. Se a necessidade proliferativa é baixa ou alta, o órgão é considerado, respectivamente, resistente ou sensível à irradiação (HELLMAN, 1997). A mitose é extremamente sensível à radiação devido à grande compactação do DNA, tornando as lesões inacessíveis às enzimas reparadoras. A resposta dos tecidos à irradiação está diretamente relacionada com a capacidade da célula reparar ou não as lesões radioinduzidas. Os tecidos de resposta rápida são aqueles que apresentam as manifestações clínicas de lesão em curto período de tempo depois da irradiação, como pele, mucosas, tecido hematopoiético e tecido linfóide. Os tecidos de resposta lenta são aqueles que apresentam suas alterações em tempo mais prolongado após a irradiação. De uma maneira geral, os tecidos conjuntivos, dentre eles, o ósseo, o muscular e o nervoso, possuem uma baixa atividade proliferativa (SEGRETO; SEGRETO, 2000). Nesses tecidos, os efeitos da irradiação são vistos tardiamente e relacionam-se com o dano nas células proliferativas (HELLMAN, 1997). A reação aguda da mucosa oral traduz-se pela presença de mucosite, enquanto efeitos crônicos são intimamente relacionados com prejuízo no leito vascular terminal referentes ao dano à microcirculação e ao estroma de suporte, sendo caracterizado por telangiectasia, oclusão de capilares devido ao espessamento das paredes de vasos sanguíneos, aumento de hialinização e deposição fibrosa (BAKER, 1982).

As neoplasias malignas possuem alto índice de atividade mitótica. Por essa razão, a radioterapia causa maior destruição nessas lesões do que nos tecidos

normais circunvizinhos (COX, 1976; BAKER, 1982; SEGRETO; SEGRETO, 2000; LANGLAND; LANGLAIS, 2002).

Apesar dos avanços das técnicas radioterápicas, ainda são comuns algumas complicações da radioterapia. Seu aparecimento está na dependência da dose de irradiação, tempo e volume do tratamento, dose de distribuição e uso de outras terapias coadjuvantes. Outros fatores são inerentes ao próprio paciente, tais como seu estado de desenvolvimento ósseo e dentário, predisposição genética, sensibilidade tissular própria e capacidade de reparação do tecido normal, mecanismo de compensação, doenças e anomalias do paciente (CAIELLI; MARTHA; DIB, 1995). Os efeitos agudos são dependentes do fator tempo e podem ser controlados pela alteração do esquema radioterápico. Os efeitos crônicos são dose-dependentes e estão associados à fibrose aumentada e ao dano na vascularização, que podem levar à necrose tecidual, infecção, formação de fístulas e úlceras não-reparáveis (MATHES; ALEXANDER, 1996; HELLMAN, 1997).

Do ponto de vista físico, as radiações podem ser classificadas em particuladas e eletromagnéticas (MARX; JOHNSON, 1987; MATHES; ALEXANDER, 1996; HELLMAN, 1997; HALL, 2000; SEGRETO; SEGRETO, 2000). As radiações particuladas possuem massa e as eletromagnéticas podem ser consideradas como ondas de diferentes comprimentos e mesma velocidade da luz ou como pacotes de energia (HELLMAN, 1997; HALL, 2000; SEGRETO; SEGRETO, 2000). A radiação eletromagnética consiste no transporte de energia através do espaço, com a combinação dos campos elétricos e magnéticos. É oriunda de um feixe de energia denominado fóton. Se este fóton originar-se do interior do núcleo atômico, é denominado raio gama. Se sua origem for de elétrons espalhados ao redor do núcleo da fonte de radiação, é chamado de raios X (MARX; JOHNSON, 1987). Os

raios X provêm de máquinas elétricas que aceleram elétrons a altas energias, que são abruptamente parados em um alvo, usualmente de ouro ou tungstênio. Parte da energia cinética dos elétrons é convertida em raios X. Os raios gama são emitidos pela decomposição de isótopos, como o Co^{60} (MATHES; ALEXANDER, 1996; HELLMAN, 1997; HALL, 2000).

A absorção da energia de radiação nos tecidos pode causar excitação ou ionização. A troca de um elétron para um nível de energia mais alto, sem a ejeção do mesmo, é denominada excitação. Se a radiação tem energia suficiente para ejetar o elétron da órbita do átomo ou molécula eletricamente neutro, o processo é chamado ionização. Neste caso, a radiação é dita ionizante (MATHES; ALEXANDER, 1996; HELLMAN, 1997; HALL, 2000; SEGRETO; SEGRETO, 2000; LANGLAND; LANGLAIS, 2002). Quando um átomo é ionizado, suas propriedades e ligações químicas modificam-se. Se o átomo ionizado fizer parte de uma macromolécula, poderá haver o rompimento da mesma. Se um número suficiente de moléculas for danificado, poderá ocorrer a perda de função, deterioração ou ainda a morte celular (LANGLAND; LANGLAIS, 2002).

O método pelo qual a radiação interage com o meio, para causar ionização, pode ser direto ou indireto. As radiações eletromagnéticas causam ionização indireta. A energia de fótons, como os raios X e gama, é utilizada para produzir uma partícula carregada, como um elétron em rápido movimento, que então, secundariamente, reagirá com a molécula alvo. Por outro lado, as partículas carregadas (alfa e beta) atingem o tecido e diretamente reagem com as moléculas alvo, tais como o oxigênio e a água (METTLER JR; UPTON, 1995).

A radiação pode ser liberada para o tumor através da implantação de fontes radioativas no interior dos tecidos (braquiterapia) ou por intermédio de fontes

externas (teleterapia) (BEUMER III; BRADY, 1978; HELLMAN, 1997; DIAS; MACULEVICIUS, 2004; SILVA; ARRUDA, 2004).

A teleterapia atravessa estruturas importantes antes de alcançar o sítio tumoral, uma vez que os aparelhos são colocados distantes do paciente. A maioria dos indivíduos portadores de neoplasias malignas na região de cabeça e pescoço é tratada com a teleterapia, na qual as glândulas salivares e o tecido ósseo são expostos a altas doses de radiação (BEUMER III; BRADY, 1978).

A teleterapia é administrada, quase que exclusivamente, com equipamentos de supervoltagem (400 keV – 2 MeV), que emprega tanto os raios X quanto os gama. A origem dos raios gama, com energia de 1,17 a 1,33 MeV é o Co^{60} , sendo este alojado em uma estrutura blindada de um aparelho (WANG, 1978). Fótons de alta energia e elétrons podem ser originados por várias máquinas elétricas, sendo que as mais comuns são as de supervoltagem, como fontes de Co^{60} e os aceleradores lineares ou de partículas (HELLMAN, 1997; DIAS; MACULEVICIUS, 2004).

No início do século passado, os esquemas radioterápicos passaram a empregar o fracionamento da dose, ou seja, a divisão da dose total administrada em pequenas frações, no intuito de aumentar a efetividade do tratamento e minimizar as suas complicações (HELLMAN, 1997).

2.3 EFEITO DA IRRADIAÇÃO SOBRE O TECIDO PULPAR E ESTRUTURAS ADJACENTES EM DENTES COMPLETAMENTE FORMADOS

A literatura científica, desde o início do século 20, preocupou-se em referenciar o efeito do uso da irradiação no dente, no que tange ao seu desenvolvimento e erupção (SMITH, 1931, 1938; STAFNE; BOWING, 1947; BRUCE;

STAFNE, 1950; BURSTONE, 1950; MEDAK; SCHOUR; KLAUBER JR, 1950; ENGLISH; TULLIS, 1951; MEDAK et al., 1952; DALE, 1953; ENGLISH; SCHLACK; ELLINGER, 1954; ENGLISH, 1956; HANSEN; ENGLISH, 1957; GOWGIEL, 1961; POYTON, 1968; WEYMAN, 1968; SHAFER; HINE; LEVY, 1974; SWEENEY; ELZAY; LEVITT, 1977; BURKE; FRAME, 1979; DURY et al., 1984; KARADZOV et al., 1985; TAKEDA et al. 1987; GEIST; KAFRAWY; SHUPE, 1988; DAHLLÖF et al., 1994; NÄSMAN et al., 1994; TAKINAMI et al., 1994; PAJARI; LANNING, 1995; KASTE et al., 1997; NÄSMAN; FORSBERG; DAHLLÖF, 1997; CHENG et al., 2000; HÖLTTÄ et al., 2002). As conseqüências dependem da dose de irradiação e do nível de desenvolvimento dentário no tempo da exposição e incluem distúrbios na formação dentinária, destruição do germe dental, desenvolvimento atrófico do dente como um todo ou de sua porção radicular, calcificação incompleta, fechamento prematuro do ápice, erupção precoce e ectópica, raízes com constrições apicais e atraso no desenvolvimento.

Apesar de o tecido pulpar não ter sido objetivo principal de análise nessas pesquisas, alguns efeitos da irradiação sobre a polpa foram comentados, tais como: distúrbios circulatórios (ENGLISH; TULLIS, 1951; POYTON, 1968), formação de massas de osteodentina (BURSTONE, 1950; MEDAK et al, 1952; GOWGIEL, 1961), atrofia pulpar (LEIST, 1927; GOWGIEL, 1961) com presença de núcleos picnóticos (SMITH, 1938), fibrose (BURSTONE, 1950, TAKEDA et al., 1987), áreas de calcificação e zonas contendo tecido adiposo (WEYMAN, 1968), infiltrado inflamatório e focos de necrose (SWEENEY; ELZAY; LEVITT, 1977).

No entanto, poucas são as citações literárias que estudaram o efeito da radioterapia no tecido pulpar de dentes completamente formados.

Leist (1927) aventou a possibilidade da irradiação ionizante ter algum efeito deletério nas estruturas dentárias, a partir da observação de um trabalhador que examinava tubos, sendo o mesmo exposto a uma grande quantidade de raios ionizantes. Depois de seis meses, o operário queixava-se de cansaço, de problemas dentários e podia-se observar uma grande perda de peso e cabelo. O paciente não teve sintomas prévios de pulpíte, no entanto, os dentes foram, um a um, tornando-se necróticos, ocorrendo o desenvolvimento de abscessos periapicais crônicos. Na ocasião, muitos de seus dentes, aparentemente hígidos, não responderam ao teste elétrico. A injúria pulpar ocorreu, em um curto espaço de tempo, em uma boca aparentemente não susceptível a cáries. Esta destruição não assumiu a forma de uma pulpíte clássica, mas de uma desintegração não inflamatória da polpa. A polpa necrótica tornou-se infectada, provavelmente, por via anacorética. O paciente ainda apresentava algumas lesões cutâneas, bem como distúrbios na membrana mucosa e nas glândulas submandibulares e parótidas.

Del Regato (1939), citado por Masella; Cupps; Laney (1972), relatou que pacientes podem apresentar hipersensibilidade às variações térmicas e ao açúcar durante o curso da radioterapia. A polpa dos dentes que estão incluídos no campo da radiação experimenta as mesmas reações inflamatórias que os tecidos moles. Assim, a hiperemia pulpar pode tornar os dentes hipersensíveis a estímulos térmicos. A recessão gengival e a conseqüente exposição do cimento podem potencializar esta sensibilidade. A inflamação do ligamento periodontal explicaria a sensação de “dente crescido” mencionada pelos pacientes.

Stafne; Bowing (1947) observaram que os dentes de um paciente de 39 anos de idade, portador de carcinoma de língua tratado com cirurgia e radioterapia, não responderam ao teste de sensibilidade pulpar, apesar de não possuírem extensas

lesões de cárie. Os autores questionaram se, em dentes com rizogênese completa, as altas doses de irradiação seriam capazes de produzir a degeneração da polpa dental.

Kalnins (1954) avaliou o efeito indireto da radiação X fracionada (170 kV) na polpa de oito dentes de um cachorro com um ano e meio de idade, valendo-se de doses de 89 a 195 Gy nos caninos e de 30 a 60 Gy nos incisivos. Os dentes do grupo experimental foram os caninos superiores, que tiveram suas coroas recobertas por platina, e os primeiros e terceiros incisivos, cujas coroas não sofreram nenhum tipo de cobertura. Todos esses dentes tiveram suas raízes protegidas por uma lâmina de chumbo. Os incisivos inferiores serviram de grupo-controle, os quais tiveram, tanto suas coroas quanto suas raízes, recobertas por chumbo. O animal foi sacrificado 206 dias após a conclusão da radioterapia, uma vez que a produção de dentina em dentes de crescimento limitado é mais lenta. Mudanças como telangiectasia, hemorragia, edema, formação aumentada de colágeno ao redor de vasos sanguíneos, metaplasia pulpar, edema endotelial dos vasos sanguíneos e linfáticos ocorreram na polpa dos animais dos grupos experimentais. Os achados observados não permitiram concluir se as alterações pulpares encontradas associavam-se aos efeitos diretos ou indiretos da radiação. Os dentes do grupo-controle revelaram estrutura histológica pulpar normal.

Greulich; Ershoff (1961) estudaram os efeitos de doses subletais de irradiação X, distribuídas em seis exposições semanais de 200 cGy, nos dentes e ligamento periodontal de ratos adultos. Foram observadas lesões periodontais em animais irradiados aos 100 dias após a primeira exposição, sendo caracterizadas pela formação de placa, recessão gengival, destruição periodontal, necrose pulpar e

exfoliação do dente. Áreas destituídas de cimento permitiram a invasão bacteriana dos túbulos dentinários, oportunizando a necrose pulpar.

Com a introdução do Co^{60} como fonte de radiação, teve-se a impressão clínica de que doses comparáveis, ou mesmo altas, poderiam ser administradas com uma menor incidência de reações deletérias nos ossos maxilares e na mucosa oral. Com esse intuito, Meyer; Shklar; Turner (1962) compararam os efeitos da radiação, em dose única, no tecido pulpar do primeiro molar de 70 ratos machos adultos, empregando Co^{60} e raios X (200 kV). Em animais experimentais expostos a 20,4 Gy de 200 kV, houve necrose completa da polpa ou necrose de odontoblastos e fibroblastos associados à hemorragia e infiltrado de células inflamatórias. Em alguns casos, houve necrose do tecido pulpar com aparente calcificação de áreas da polpa. As mudanças pulpares foram mais acentuadas nos animais irradiados com 20,4 Gy, do que naqueles que receberam dosagens inferiores (10,2 e 15,3 Gy).

A polpa dos ratos expostos à irradiação de Co^{60} mostrou-se relativamente normal, mesmo naqueles animais submetidos a 20,4 Gy. Algumas pequenas alterações consistiram no espessamento das paredes dos vasos sangüíneos e, ocasionalmente, alguma degeneração na substância intercelular do tecido conjuntivo e células odontoblásticas.

Frank; Herdly; Philippe (1965) avaliaram 61 dentes cariados de pacientes submetidos à teleterapia com Co^{60} ou radiação X associada à braquiterapia. As características histológicas das lesões são similares às observadas em cáries típicas. No entanto, localizam-se difusamente nas faces livres dos dentes, assim como nas porções incisais e pontas de cúspides. Uma camada de dentina secundária é depositada na superfície pulpar abaixo da zona de cárie. As bactérias são capazes de invadir os túbulos dentinários, dirigindo-se à polpa e,

conseqüentemente, promovendo inflamação. Esta resposta inflamatória, primeiramente, localiza-se nas adjacências da lesão em dentina, permanecendo a estrutura da região pulpar apical com aspecto de normalidade, contendo odontoblastos bem diferenciados. Com a evolução do processo, ocorre necrose na polpa coronária, estendendo-se, progressivamente, por toda cavidade pulpar, associada à invasão bacteriana.

Meyer; Shklar; Turner (1966) avaliaram o efeito da aplicação da ortovoltagem convencional (radiação X, 200 kV) e do Co^{60} , quando do emprego de 15,3 Gy, no reparo gengival e pulpar de incisivos inferiores em ratos. Para tanto, gengivectomia e raspagem óssea, assim como exposição pulpar, foram efetuadas nos animais, sendo os mesmos expostos aos dois tipos de radiação e sacrificados dez dias após. As observações microscópicas evidenciaram que a polpa nos animais irradiados estava normal, não interessando a forma da radiação empregada. A porção incisal da polpa foi coberta com dentina, sendo mínima a quantidade de infiltrado inflamatório, visto que um pequeno número de linfócitos estava presente. No entanto, quando do emprego da ortovoltagem, houve evidência de degeneração odontoblástica em alguns animais, mas as alterações regressivas não eram acentuadas. Quanto ao reparo gengival, este foi normal no grupo-controle e no grupo que empregou o Co^{60} . Neste último, quando comparado ao grupo-controle, houve uma leve tendência para a presença de um epitélio mais delgado. Também células inflamatórias ocasionais foram observadas e uma considerável vascularização foi notada em alguns animais. O tecido conjuntivo presente foi mais granular e menos fibroso do que nos animais não irradiados. No entanto, nos animais irradiados com ortovoltagem, o reparo foi considerado mínimo ou ausente. Os autores concluíram que a radiação com Co^{60} , após procedimentos cirúrgicos experimentais, parece permitir um reparo mais

regular da mucosa oral, do que quando uma dose equivalente de radiação com ortovoltagem é empregada.

Poyton (1968) relatou que o efeito de altas doses de radiação X em dentes completamente formados e erupcionados é a perda de substância dentária na região cervical, não exclusivamente nas áreas proximais, mas também nas superfícies livres. Este processo pode evoluir até promover a separação da coroa da raiz, expondo freqüentemente a polpa. A superfície do dente sofre descalcificação similar, quando a mesma apresenta um processo carioso. A sondagem da lesão indica que a dureza é menor do que a de um dente normal, entretanto, não é possível remover a substância dentária com uma colher de dentina.

Blozis; Robinson (1968) relataram que os dentes de indivíduos submetidos à radioterapia podem tornar-se mais sensíveis a temperaturas extremas, após o referido tratamento, sendo desconhecida a razão de tal ocorrência. Algum alívio para este desconforto poderia ser obtido pela aplicação tópica de flúor ou uso de pastas dessensibilizantes.

Taylor et al. (1969) injetaram ^{236}Ra e ^{239}Pu em 45 e 42 cachorros, respectivamente, de 16 meses de idade. A diminuição do diâmetro das cavidades pulpares do primeiro molar inferior esquerdo foi calculada, radiograficamente, comparando-a com a de animais controles. A observação foi realizada até os nove anos e oito meses de vida dos animais. Nenhuma mudança significativa, nos níveis de diminuição do volume pulpar, ocorreu como resultado da irradiação, indicando que os odontoblastos são células relativamente radorresistentes.

Hutton et al. (1974) irradiaram as arcadas superiores de dois macacos adultos objetivando avaliar, microscopicamente, o efeito de doses terapêuticas de Co^{60} no tecido pulpar de dentes permanentes. O protocolo da irradiação foi doses de 3,33

Gy, três vezes por semana, por sete semanas. Quatro dentes inferiores não irradiados serviram como controle, sendo extraídos previamente ao tratamento radioterápico. Dezenove dentes superiores foram extraídos e avaliados com o emprego de níveis de radiação de aproximadamente 30, 50 e 70 Gy, bem como após um e dois meses do término do tratamento com 70 Gy. Nenhuma diferença histológica foi demonstrada na polpa devido à irradiação, em qualquer dose empregada ou intervalo de tempo, sugerindo que este é um tecido radiorresistente, devido a sua maturidade.

Nickens et al. (1977) avaliaram o efeito da teleterapia fracionada com Co^{60} , em polpas de dentes restaurados de macacos, valendo-se de dois animais, sendo um irradiado e outro utilizado como controle. Foram confeccionadas restaurações em resina composta, coroas de ouro e de amálgama em 14 dentes de cada macaco. A dose total de irradiação aplicada no modelo experimental foi de 76 Gy, distribuída em 38 sessões de 2 Gy, 5 dias por semana, durante 52 dias. Os animais foram sacrificados 34 dias após o término da radioterapia. Os dentes foram processados histologicamente e corados com hematoxilina de Harris e eosina alcoólica (HE). Microscopicamente, não houve alterações patológicas discerníveis entre as polpas irradiadas e as do grupo-controle. Todos os dentes restaurados mostraram formação de dentina reparadora na cavidade pulpar. Os autores discutem a possibilidade do esmalte, dentina e cimento protegerem o tecido pulpar da radiação ionizante. Uma vez tendo sido completada a função formativa da polpa, o tecido tornar-se-ia mais estável, com concomitante aumento na resistência à radiação.

Matson et al. (1978) submeteram os maxilares esquerdos de três macacos adultos a doses terapêuticas de Co^{60} . O tratamento consistiu na aplicação fracionada de 4,7 Gy, em um total de 20 sessões, três vezes por semana, por sete semanas,

perfazendo uma dose total de 63 a 70 Gy, nos ápices radiculares. Após a radioterapia, lesões periapicais foram induzidas em seis dentes de cada animal, mediante abertura coronária e exposição do canal radicular ao ambiente oral por seis semanas e posterior selamento da cavidade pulpar por quatro semanas. Concluído este período, o tratamento endodôntico convencional foi realizado nestes dentes. As lesões periapicais foram acompanhadas radiograficamente até que os animais fossem sacrificados, o que ocorreu após 37, 58 e 75 semanas da irradiação. Radiograficamente, houve uma tendência das lesões repararem, apesar do processo parecer mais demorado nos animais do grupo experimental. Microscopicamente, a maior variação da resposta ao tratamento endodôntico foi causada pelo nível da obturação e não pela irradiação em si. A presença de reabsorção radicular e inflamação estavam associadas à sobre-extensão da obturação, particularmente quando debris necróticos e partículas de cimento foram empurrados para os tecidos periapicais. A irradiação pareceu não ter efeito na resposta à terapia endodôntica, exceto pela reduzida atividade osteoblástica, resultando em alta incidência de reparo fibroso. A polpa, ligamento periodontal e osso alveolar de dentes hígidos no campo irradiado estavam microscopicamente similares àqueles do lado não irradiado, não sendo verificada nenhuma patologia nesses tecidos pela MO.

Anneroth; Holm; Karlsson (1985) avaliaram 54 dentes de 20 pacientes irradiados para tratamento de câncer na região de cabeça e pescoço. Dezoito dentes de oito pacientes foram usados como controle. Além de xerostomia, os primeiros sintomas clínicos evidenciados nos pacientes do grupo experimental foram mucosite e dor nos dentes quando expostos a variações térmicas. Em alguns, esta hipersensibilidade a mudanças de temperatura evoluiu para pulpíte, com dores persistentes e intensas em certos dentes. Naqueles casos em que a dor foi

reversível e pôde ser manejada com medicação, o tratamento endodôntico não foi iniciado. Ocorreram cáries atípicas cervicais circunferenciais, de evolução rápida, permitindo fraturas coronárias, sendo primeiramente afetados os incisivos e pré-molares inferiores. Na maioria dos dentes, a polpa sofreu graus variados de pulpíte e necrose. Em sete dos 20 casos analisados, a polpa, histologicamente, mostrou transformação metaplásica na forma de fibrose e hialinização. A formação de dentina secundária foi evidenciada em seis desses dentes. Em alguns casos, o ligamento periodontal exibiu necrose, hialinização, celularidade e vascularidade diminuída com desorganização das fibras principais. Os autores relacionaram as mudanças pulpares à atividade de cárie ou a tratamentos dentários prévios desses pacientes.

Fawzi; Shklar; Krakow (1985) selecionaram 36 ratos de 56 dias de idade, dividindo-os em dois grupos. O grupo 1 foi irradiado com uma dose única de 4 Gy, no corpo inteiro, valendo-se de uma fonte de césio. O grupo 2 serviu como controle e não foi irradiado. Três semanas após, um microscópio dental foi empregado para a execução dos seguintes procedimentos no primeiro molar superior: preparo cavitário e selamento da cavidade; exposição pulpar e capeamento com óxido de zinco e eugenol e exposição pulpar, mantendo-se o dente sem selamento. Dois animais de cada grupo foram sacrificados em intervalos de duas, quatro e oito semanas após o procedimento. Pôde-se evidenciar, durante as manobras de exposição pulpar, que os animais irradiados demonstraram alteração no suprimento vascular da polpa. O preparo cavitário sem exposição pulpar pareceu não causar injúrias microscópicas mais graves nos animais irradiados, quando comparados com o grupo-controle. Duas semanas após este procedimento, presença de infiltrado inflamatório e hiperemia foram visualizadas no tecido pulpar. A presença de polpa normal foi verificada no período de quatro semanas, em ambos os grupos. Os resultados

mostraram que a irradiação, na dose empregada, resultou na redução da resposta normal da polpa ao trauma e infecção, induzida pela exposição pulpar, uma vez que necrose e lesão periapical foram percebidas nos animais do grupo 1, enquanto os espécimes do grupo-controle apresentaram pouca evidência de periapicopatia. Em ambos os grupos, não houve diferença significativa na reação pulpar, quando a exposição pulpar foi selada com óxido de zinco ou quando os dentes foram mantidos abertos. Não houve alterações patológicas nas polpas dos molares não tratados dos animais irradiados, com exceção de degeneração de odontoblastos na região de cornos pulpares.

Selak; Seremet; Milosevic (1993) examinaram, histologicamente, a polpa dental, o periodonto, a porção alveolar do osso e a gengiva de 11 porcos expostos a 48 Gy de irradiação, fracionados em 3,68 a 4 Gy por sessão, por intermédio de acelerador linear. Foram observadas hemorragia extensa e dilatação de vasos sanguíneos nesses tecidos. As células endoteliais mostraram sinais de edema, protruindo em direção ao lúmen do vaso. Houve pequenos defeitos na mucosa gengival devido à necrose e descamação do epitélio.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 *Geral*

Avaliar, microscopicamente, em polpa de dentes de ratos, o efeito imediato e tardio da teleterapia fracionada por Co^{60} .

3.1.2 *Específicos*

Em polpas dentárias de ratos submetidos à teleterapia fracionada por Co^{60} , eutanasiados logo após a conclusão do esquema radioterápico e aos 30 dias subseqüentes, e em polpas de animais não expostos à radiação, buscou-se:

a) avaliar, histologicamente, em cortes de molares corados com HE:

- a presença de processo inflamatório;
- a presença e extensão de alterações nucleares em fibroblastos e odontoblastos;
- a presença e extensão de áreas de hialinização da matriz, comparando os resultados entre os grupos experimentais e controles;

b) quantificar, morfometricamente, o percentual de colágeno em cortes de molares corados com Picrossírius, comparando os resultados entre os grupos estudados;

c) descrever, através da MET, as alterações nucleares evidenciadas em fibroblastos presentes no terço médio pulpar de incisivos, buscando uma analogia entre os efeitos percebidos em MO e MET.

3.2 HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

- A teleterapia fracionada por Co^{60} promove, no tecido pulpar de dentes de rato, processo inflamatório, alteração nuclear, hialinização da matriz e aumento no

percentual médio de colágeno, sendo essas modificações percebidas imediatamente após o esquema radioterápico;

- A teleterapia fracionada por Co^{60} promove, no tecido pulpar de dentes de rato, processo inflamatório, alteração nuclear, hialinização da matriz e aumento no percentual médio de colágeno, sendo essas modificações percebidas 30 dias após o término da terapia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO

A presente pesquisa inseriu-se no paradigma tradicional quantitativo, sob a forma de ensaio clínico controlado e randomizado (JEKEL; ELMORE; KATZ, 2002).

4.2. LINHA DE PESQUISA

O experimento inseriu-se na Linha de Pesquisa denominada “Neoplasias benignas e malignas da região bucomaxilofacial – estudos clínicos, imunológicos e anátomo-patológicos”.

4.3 VARIÁVEIS

4.3.1 *Dependentes*

- a) processo inflamatório
- b) alteração nuclear
- c) hialinização da matriz
- d) percentual médio de colágeno em polpa de dentes de rato

4.3.2 *Independentes*

- a) radioterapia na região da cabeça
- b) tempo de observação (concluída a radioterapia e 30 dias após).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados para o experimento 45 ratos albinos machos adultos, com 80 dias de idade, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, pesando entre 220 e 290g, no início da radioterapia (peso médio de 262,93g). A aquisição e pesagem (Apêndice A) desses animais procederam-se no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do ICBS da UFRGS.

A realização da parte experimental deste trabalho foi iniciada após a aprovação do Projeto de Pesquisa pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS, (protocolo 0106/03) (Anexo A).

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais deste experimento foram divididos em quatro grupos distintos:

- Grupo 1 (experimental 1) - 15 animais submetidos à dose radioterápica de 60 Gy, sendo eutanasiados ao final da radioterapia;
- Grupo 2 (experimental 2) - 15 animais submetidos à dose radioterápica de 60 Gy, sendo eutanasiados 30 dias após o término da radioterapia;
- Grupo 3 (controle 1) - sete animais que não foram submetidos à radioterapia, sendo eutanasiados juntamente com o grupo experimental 1;
- Grupo 4 (controle 2) - oito animais que não foram submetidos à radioterapia, sendo eutanasiados juntamente com o grupo experimental 2.

4.6 PROCEDIMENTOS

4.6.1 *Manutenção dos modelos animais*

Os animais de cada grupo foram identificados individualmente com cores distintas na cauda e acomodados em gaiolas específicas (Figura 1a), sendo divididos em grupos de cinco.

Os animais tiveram à sua disposição, em todo período experimental, alimentação sólida¹ e água *ad libitum*. Foi disponibilizada, para este fim, uma sala no prédio 64 do Hospital São Lucas da PUCRS, nas dependências do Laboratório de

¹ Ração Nuvilab-Cr1® Nuvital Nutrientes S.A., São Paulo, SP, Brasil

Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da PUCRS, onde os animais recebiam exclusivamente luz natural.

4.6.2 *Protocolo de radioterapia*

Para a imobilização dos animais, durante a sessão de radioterapia, utilizou-se uma contenção plástica individual delineada para o estudo (Figura 1b), de forma que exclusivamente suas cabeças e caudas ficassem para fora da mesma (Figura 1c).

A região da cabeça dos animais foi irradiada no SERP, através da utilização de aparelho² de teleterapia por Co⁶⁰ (Figura 1d) com energia de 1,25 MeV.

Os animais dos grupos experimentais 1 e 2 foram submetidos a uma sessão diária de radioterapia, de segunda a sexta-feira, durante seis semanas, totalizando 30 sessões. A dose total de radiação foi de 60 Gy ao final do tratamento, fracionada em doses de 200 cGy/dia. O tempo médio de radioterapia diária foi de 14,83 minutos.

Para o recebimento da dose radioativa, grupos de 10 animais foram sucessivamente deslocados de sua sala de manutenção até o SERP. Os animais contidos foram colocados na posição de decúbito ventral em um dispositivo de madeira com canaletas (Figura 1e). Isto permitiu a padronização do posicionamento dos animais e da incidência da radiação utilizada. A distância entre o ponto de emissão do feixe radioativo e a superfície cutânea dos animais foi de 60 cm e a área do campo de radiação equivalente a um quadrado de 20 X 20 cm.

A radioterapia foi executada em 10 animais de cada vez. Exclusivamente suas cabeças encontravam-se no interior do campo radioativo, assegurando que a porção referente às mandíbulas ficassem expostas à irradiação (Figura 1f). Essa disposição

² Philips, modelo XK 5101, Eindhoven, Netherlands; fonte de Co⁶⁰: janeiro/1979, Ottawa, Canadá

foi adaptada da metodologia descrita por English; Schlack; Ellinger (1954) e por English (1956).

O protocolo do tratamento radioterápico (SAGOWSKI et al., 2002, 2004) foi executado pela equipe técnica do SERP.

Os 15 animais dos grupos-controle foram submetidos aos mesmos procedimentos dos grupos experimentais, entretanto não foram irradiados.

4.6.3 *Eutanásia dos animais*

Os animais foram eutanasiados no Laboratório de Neuroanatomia, no DCM, no ICBS da UFRGS. O transporte dos ratos para este local foi feito no interior de suas gaiolas, em veículos terrestres, locomovendo-se em velocidade e condições apropriadas. Antes da eutanásia, os animais foram novamente pesados, sendo os valores devidamente anotados (Apêndice B).

Visando a obter a fixação do tecido pulpar, que foi o objetivo de análise deste estudo, realizou-se a perfusão nos ratos.

Primeiramente os mesmos foram anestesiados, intraperitonealmente, empregando-se tiopental sódico³ e cloridrato de S + cetamina⁴, na dose de 22mg/kg.

³ Thionembotal, Illinóis, EUA

⁴ Ketamin-S +, Itapira, SP, Brasil



Figura 1 – a. Animais dispostos em gaiolas; b. contenção plástica; c. animais no interior da contenção; d. aparelho de radioterapia; e. dispositivo com canaletas para apreensão das contenções; f. animais posicionados no campo de radiação.

O animal, devidamente anestesiado, foi disposto em posição de decúbito dorsal, tendo suas patas fixadas nas extremidades da bancada.

Realizou-se uma incisão longitudinal na sua pele do ventre, estendendo-se desde a região inferior do esterno até a porção abdominal inferior (Figura 2a). Fez-se o rebatimento da pele do animal, de modo a evidenciar a membrana mucosa que reveste a cavidade abdominal. Incisou-se, transversalmente ao longo do eixo do animal, o tecido de revestimento logo abaixo do osso esterno. Após o rebatimento deste tecido, expôs-se o diafragma (Figura 2b) que foi excisado, visualizando-se, desta forma, a caixa torácica. Para ampliação do campo de trabalho, efetuou-se um corte de relaxamento nas costelas do rato (Figura 2c), permitindo o rebatimento da porção torácica ventral para cima (Figura 2d), deixando o coração em evidência. Com seringa de insulina⁵, aplicou-se 0,1 ml/100g de heparina 5000 UI⁶ no coração (Figura 2d). A seguir, pinçou-se a artéria aorta abdominal descendente (Figura 2e), localizada abaixo do coração, de modo que a perfusão se processasse exclusivamente dessa região em direção à cabeça. Passou-se um fio de sutura⁷ ao redor da artéria aorta ascendente (Figura 2f). Incisou-se, o ventrículo esquerdo do coração, por onde se introduziu um catéter venoso central⁸ (Figura 2g), até que a mesma fosse percebida ao penetrar na artéria aorta ascendente; ocasião em que um nó duplo foi dado no fio de sutura, previamente disposto ao redor da mesma (Figura 2h). Uma incisão realizada no átrio direito do coração (Figura 2i) permitiu a saída do sangue do animal.

Em dois animais de cada grupo experimental e em um animal de cada grupo-controle, usou-se solução contendo glutaraldeído a 2%, para a fixação do tecido

⁵ BD Ultra-Fine™, Franklin Lakes, NJ, EUA

⁶ Lique mine, Roche, Basileia, Suíça

⁷ Injecta, Diadema, SP, Brasil

⁸ B-D, Curitiba, PR, Brasil

pulpar, visto que nesses as polpas dentais foram avaliadas, tanto em MO, quanto em MET. Nos outros animais, estudados exclusivamente através da MO, a solução fixadora empregada foi o paraformaldeído a 4%.

Previamente ao emprego da solução fixadora, o sistema circulatório da cabeça dos animais foi lavado com 50 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 (Tampão Millonig 2 vezes concentrado). Para tanto, uma seringa luer lock⁹ foi acoplada na porção terminal da cânula de *intracath*, permitindo o acesso das substâncias ao sistema circulatório do animal. A seguir, 50 ml de solução de glutaraldeído a 2% ou de paraformaldeído a 4%, dependendo do caso, foi injetado lentamente na circulação do rato.

Finda a perfusão, a hemimandíbula esquerda do animal foi dissecada. Com o auxílio de disco dupla face¹⁰, acoplado à peça de mão reta¹¹ e micromotor elétrico¹², sob refrigeração com soro fisiológico, realizaram-se cortes, na mesial do primeiro e na distal do terceiro molar inferior esquerdo, paralelos ao longo eixo desses dentes. Obteve-se, desta forma, uma porção da mandíbula, contendo os três dentes molares e o terço médio do incisivo, que foi destinada à avaliação sob MO.

⁹ B-D Yale, Franklin Lakes, NJ, EUA

¹⁰ KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil

¹¹ Kavo, Joinville, SC, Brasil

¹² Beltec, Araraquara, SP, Brasil

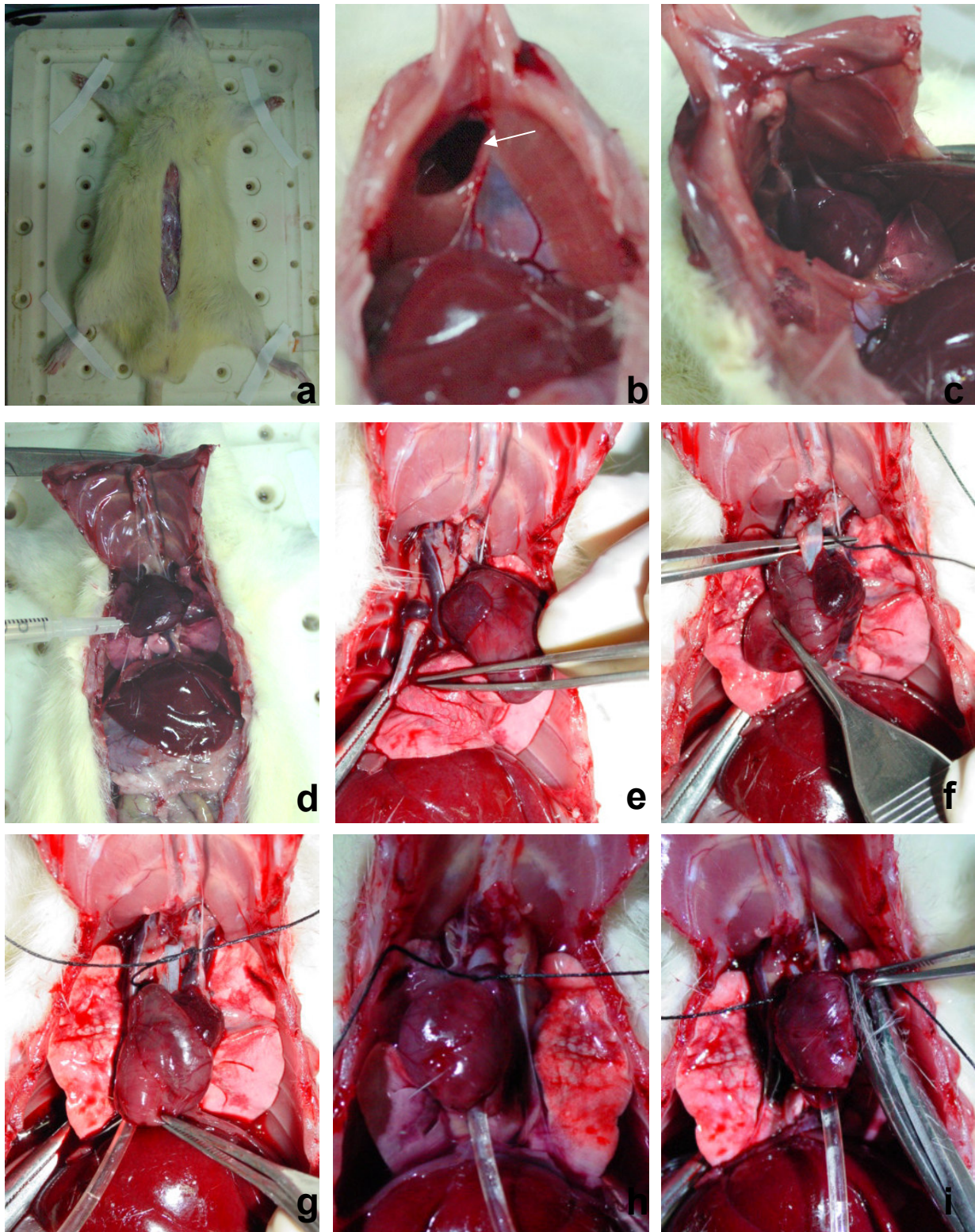


Figura 2 – a. Incisão no ventre do animal; b. diafragma excisado; c. corte de relaxamento nas costelas; d. aplicação de heparina no coração; e. pinçamento da aorta abdominal descendente; f. fio de sutura circundando a aorta ascendente; g. catéter venoso central no ventrículo esquerdo; h. nó duplo na aorta ascendente; i. incisão no átrio direito.

Nos espécimes perfundidos com glutaraldeído a 2%, foi efetuado outro corte abaixo das raízes dos dentes molares, perpendicular ao longo eixo dos mesmos. Duas peças foram assim obtidas: uma superior, contendo os três molares, destinada à MO, e outra inferior, contendo o terço médio do dente incisivo inferior esquerdo, destinado à MET (Figura 3).

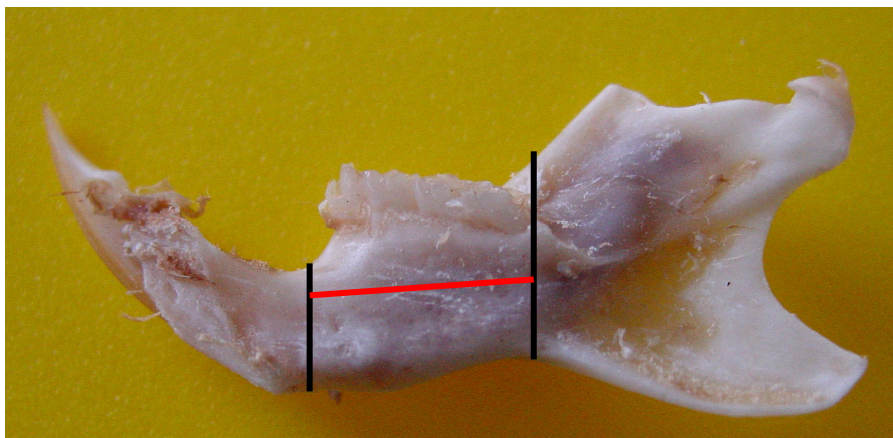


Figura 3 – Hemimandíbula de rato. O fragmento delimitado pelas linhas pretas foi destinado à MO, nos animais perfundidos com paraformaldeído a 4%. Esse fragmento foi ainda dividido (linha vermelha) em duas porções: superior, destinado à MO, e inferior, destinado à MET, nos espécimes perfundidos com glutaraldeído a 2%.

Os espécimes fixados em paraformaldeído a 4% e as peças contendo os dentes molares fixadas em glutaraldeído a 2% foram acondicionadas individualmente em potes plásticos identificados, contendo a solução fixadora.

4.6.4 *Preparo e avaliação histológica dos espécimes por microscopia óptica*

As amostras foram descalcificadas em ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 17% (pH 7,0), no Laboratório de Envelhecimento Celular da PUCRS. As mesmas

foram mantidas imersas na solução, sob agitação¹³ constante, a uma temperatura de 44°C, sendo a substância renovada duas vezes por semana, durante o período de descalcificação, que foi de aproximadamente cinco meses.

O controle do tempo de descalcificação foi realizado semanalmente, mediante a tentativa de transfixação do espécime com uma agulha¹⁴.

Os espécimes foram processados pela técnica de rotina (HE), para sua posterior inclusão em blocos de parafina¹⁵. Neste momento, teve-se o cuidado para que o plano, formado pelo longo eixo dos três dentes molares, ficasse paralelo ao plano de uma das superfícies do bloco, de modo que cortes seriados de 5 µm de espessura pudessem ser obtidos, da porção pulpar coronária, no sentido do longo eixo dentário.

Foram realizados seis cortes longitudinais de 5 µm de espessura, valendo-se de micrótomo de deslize¹⁶. Os mesmos foram coletados em lâminas de vidro¹⁷ aquecidas a 60° C em estufa¹⁸, por 1 hora e 30 minutos, cobertas previamente com Poly-L-lysine¹⁹.

Posteriormente, realizou-se a coloração dos cortes empregando-se, consecutivamente, Picrossírius e HE. Assim, foram obtidas três lâminas histológicas com cada coloração.

¹³ Yamato Water Bath Incubator, model BT – 25, São Francisco, Califórnia, EUA

¹⁴ BD Ultra-Fine™, Franklin Lakes, NJ, EUA

¹⁵ Nuclear, Diadema, SP, Brasil

¹⁶ Leica 2000R, Houston, Texas, EUA

¹⁷ Bioglass, SP, Brasil

¹⁸ Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil

¹⁹ Sigma, St Louis, Missouri, EUA

4.6.4.1 Avaliação dos espécimes corados com HE

O local de observação dos cortes histopatológicos foi a polpa coronária do molar inferior esquerdo que apresentasse a maior área correspondente a este tecido, em uma das três lâminas.

As lâminas histopatológicas coradas com HE foram analisadas por um único observador, desconhecedor do grupo de estudo analisado. Tomou-se o cuidado para que, exclusivamente, 10 a 15 cortes fossem avaliados em cada sessão, evitando que o cansaço do operador pudesse interferir nos resultados da classificação. Todas as lâminas foram avaliadas em duplicata, com intervalo de tempo de duas semanas entre a primeira e a segunda análise.

As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico²⁰, em aumentos de 40, 100 e 400 vezes, no Laboratório de Biologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

As seguintes variáveis foram consideradas, empregando os escores abaixo discriminados:

- Processo inflamatório

1. *Ausente* – tecido pulpar composto por tecido conjuntivo frouxo, isto é, tendo equivalência entre o conteúdo celular e a substância intercelular, estando a camada dos odontoblastos organizada;

2. *Presente* - tecido pulpar exibindo alterações vasculares, evidenciados pela presença de hiperemia e de exsudação plasmática marcantes, predominando uma desorganização da estrutura normal da polpa, com presença de infiltrado neutrofílico e/ou linfoplasmocitário, podendo a disposição da camada odontoblástica estar comprometida ou não.

²⁰ Olympus Optical Co Ltd, model BX 41TF e U-MDOB3, Japão

- Alteração nuclear

1. *Ausente* - presença de núcleos normais em todo o campo analisado, ou seja, núcleos exibindo homogeneidade de coloração;
2. *Presente em moderada quantidade de células* - presença de núcleos alterados apresentando áreas vacuoladas fracamente coradas, assemelhando-se a “bolhas de sabão”, tanto presentes nas células odontoblásticas, quanto nas localizadas no âmago pulpar, em uma moderada quantidade das células pulpares;
3. *Presente na maioria das células* - presença de núcleos alterados com as características já descritas, na grande maioria das células pulpares do campo analisado.

- Hialinização da matriz

1. *Ausente* - ausência de áreas com hialinização, ou seja, polpa exibindo fibras colágenas dispostas frouxamente no tecido;
2. *Focal* - matriz colágena exibindo áreas focais de hialinização, demonstrada através de regiões fortemente coradas, localizadas de forma dispersa no tecido;
3. *Extensa* - matriz colágena predominantemente hialinizada, ocupando grande parte do campo analisado.

Os escores para cada variável foram anotados em tabelas. Os espécimes que tiveram, após as duas avaliações, escores diferentes, foram reclassificados. O escore final para cada variável, neste caso, foi aquele que ocorreu pelo menos em duas das três avaliações.

4.6.4.2 Avaliação morfométrica dos espécimes corados com Picrossírius

O local de observação dos cortes histopatológicos corados com Picrossírius, técnica específica para o estudo do colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979) foi a polpa coronária do molar inferior esquerdo que apresentasse a maior área correspondente a este tecido, em uma das três lâminas.

Assim, a imagem correspondente a este local foi capturada, em um aumento de 200 vezes, utilizando-se o microscópio óptico²¹ acoplado ao sistema digital²² de captação de imagens, por intermédio do Programa Image Pro Plus. Quando a área do tecido pulpar, presente na lâmina a ser analisada, foi superior à área correspondente do campo microscópico, duas imagens foram obtidas de cada espécime, garantindo que grande parte da polpa coronária pudesse ser incluída na análise.

Nestas imagens, foram selecionadas três áreas retangulares de tamanhos variados, medidas em μm^2 (Figura 4 a, b). Procurou-se abranger a maior área pulpar possível de cada espécime.

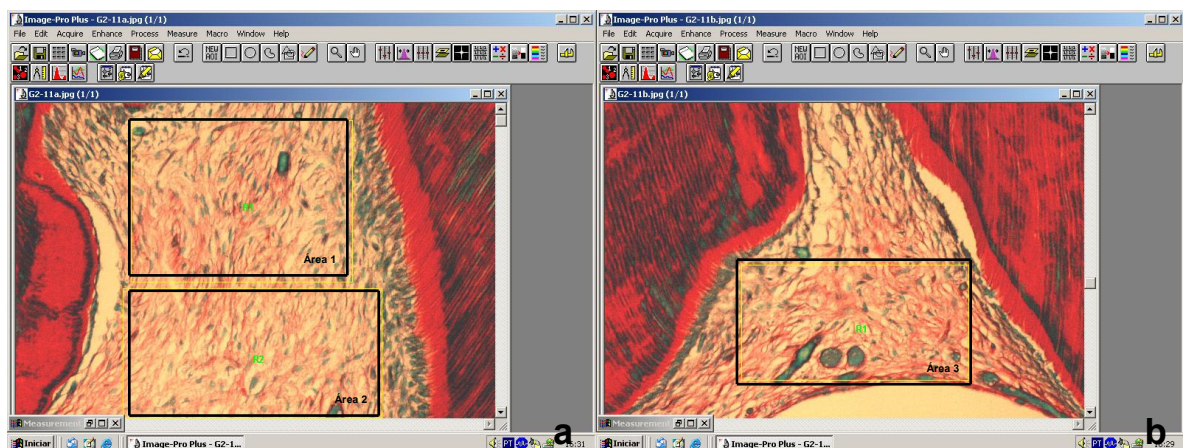


Figura 4 – a, b. Imagens de um espécime coradas com Picrossírius, onde três áreas retangulares foram delimitadas para análise.

²¹ Olympus AX 70, New York, NY, EUA

²² Olympus U-PMTVC, Salt Lake, Utha, EUA

As imagens correspondentes às áreas retangulares do tecido pulpar foram, então, inseridas no *software* Adobe Photoshop 7.0²³, visando à substituição das cores presentes na imagem, exceto do vermelho, por branco, objetivando a permanência do espaço ocupado pelo colágeno (Figura 5 a,b,c). De posse da imagem ocupada exclusivamente pelas cores vermelha e branca, luminosidade igual a 100 foi conferida a mesma, de forma que as regiões fortemente vermelhas fossem mantidas, enquanto as palidamente coradas com essa cor fossem removidas da imagem final, obtendo zonas representativas do colágeno (Figura 5d).

Empregando um artifício deste mesmo programa de computador, as áreas vermelhas foram convertidas para a cor preta (Figuras 5 e,f), a partir da seleção da cor branca com tolerância de 32 níveis. Dessa forma, uma imagem contendo exclusivamente as cores preto e branco foi obtida, sendo a zona preta correspondente ao colágeno. Essa seqüência de eventos foi repetida em triplicata para cada imagem, de tal maneira que, para cada imagem pulpar, três imagens em preto e branco foram obtidas.

As imagens em preto e branco foram importadas para um *software* de análise de imagens digitalizadas²⁴, visando à quantificação da área pulpar ocupada por fibras colágenas, mediante a relação da região da polpa ocupada pelas fibras versus a área total da polpa. Assim, a zona preta, correspondente ao colágeno, e a área total de cada imagem foram mensuradas, em μm^2 , e anotada em tabelas próprias. Os resultados correspondentes à área ocupada pelo colágeno foram expressos em percentagem. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Envelhecimento Celular do IPB da PUCRS e no Laboratório de Histologia da PUCRS.

²³ Adobe Inc., San José, Califórnia, EUA

²⁴ Image-Pro Plus® (versão 4.0), Silver Spring, MD, EUA

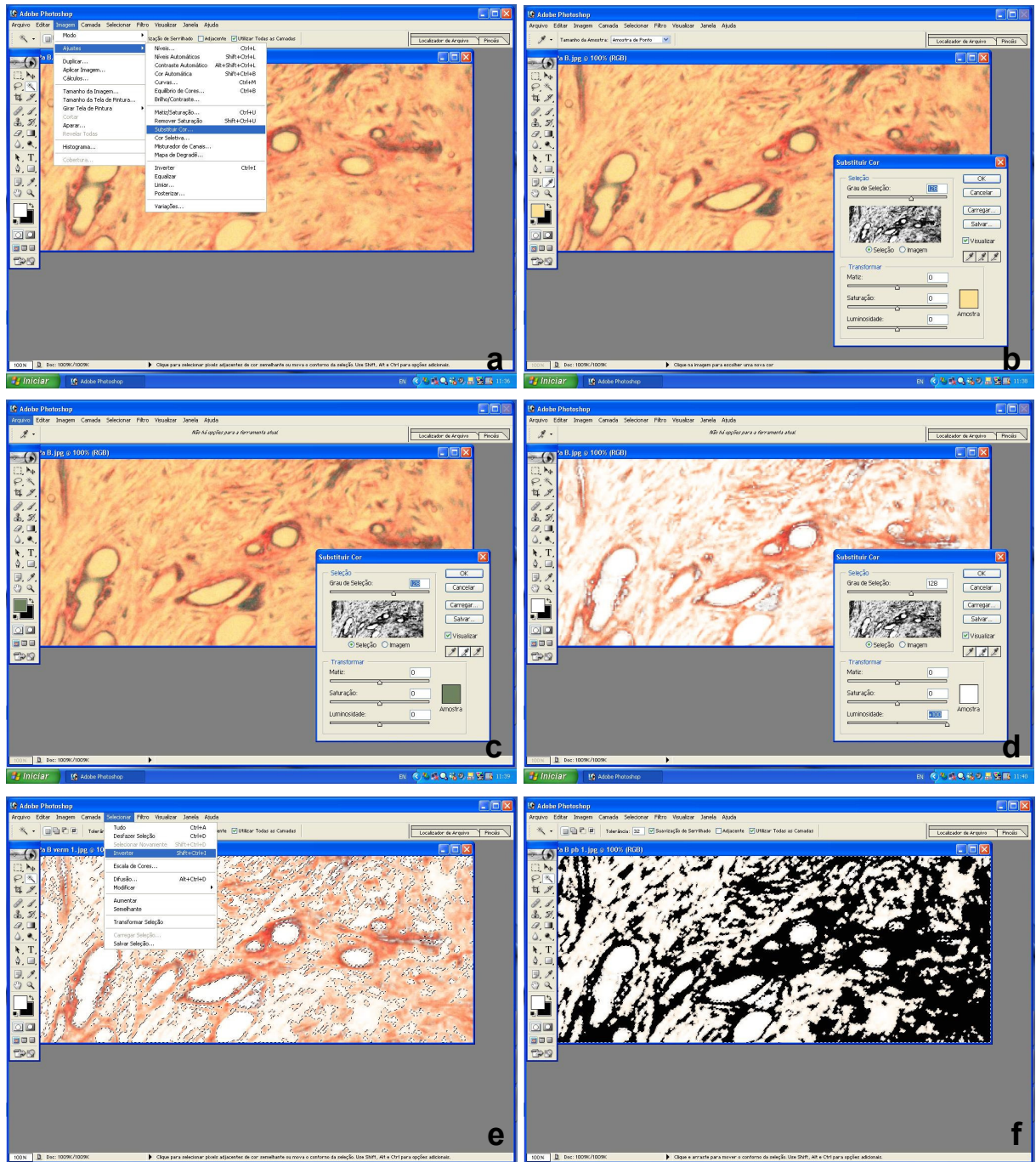


Figura 5 – a. Imagem demonstrando a seqüência para substituição das cores, exceto do vermelho, por branco; b,c. Substituição da cor de fundo da imagem (b) e do núcleo das células (c) por branco; d. Aplicação da luminosidade igual a 100; e. Inversão da cor vermelha pela preta; f. Imagem final, contendo as cores preto e branco, sendo o preto a área correspondente ao colágeno.

Para cada espécime, a porcentagem correspondente à região ocupada pelo colágeno foi obtida a partir da soma das áreas de colágeno, dividida pela soma total das áreas analisadas.

4.6.5 Preparo e avaliação histológica dos espécimes em MET

O preparo e avaliação dos espécimes em MET foram realizados no CMM da ULBRA, Canoas/RS. Conforme demonstrado anteriormente, o fragmento da hemimandíbula esquerda correspondente aos dentes molares e a porção mediana do incisivo inferior dos espécimes perfundidos com glutaraldeído a 2% foi dividido em duas partes (Figura 3): superior, destinada à MO e inferior, destinada à MET.

Imediatamente após a perfusão ter sido concluída, a hemimandíbula esquerda foi dissecada e os dois fragmentos foram obtidos, sendo imersos em glutaraldeído a 2%.

O tecido ósseo do fragmento inferior que envolvia a porção mediana do incisivo foi cuidadosamente removido com alveolótomo²⁵. De posse da porção do incisivo, a mesma foi clivada longitudinalmente, por intermédio de um alicate de corte²⁶. Nesta manobra, os mordentes do alicate foram posicionados paralelos ao longo eixo do fragmento dental, na porção de maior diâmetro, ou seja, na posição do incisivo voltada para a base da mandíbula e para a oclusal dos molares. Neste momento, fez-se pressão com o alicate, de modo a clivar o incisivo, expondo o tecido pulpar. Toda essa seqüência operatória foi realizada estando o espécime mergulhado em glutaraldeído a 2%.

Com o auxílio de uma agulha de insulina²⁷, a polpa foi descolada do leito do canal radicular do incisivo, sendo imediatamente imersa na solução fixadora, em placa de Petri²⁸. Com uma lâmina de barbear, foram obtidos, através de cortes contínuos e únicos, porções pulpares correspondentes a cada espécime, de aproximadamente 1 mm³.

²⁵ Edlo, Canoas, RS, Brasil

²⁶ Mundial, Gravataí, RS, Brasil

²⁷ BD Ultra-Fine™, Franklin Lakes, NJ, EUA

²⁸ Plast Labor, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

As amostras foram lavadas em solução tampão fosfato 0,1 M, por três vezes, em banhos de 30 minutos. O tetróxido de ósmio 1% tamponado²⁹ foi empregado para a pós-fixação do material, durante 30 minutos.

A desidratação dos espécimes procedeu-se de forma seriada em etanol³⁰ 30%, 50%, 70%, 95% e 100%. Todas as passagens tiveram duração de 10 minutos, com exceção das duas últimas que foram de 30 minutos cada uma.

A pré-embebição dos espécimes pulparens foi feita, seqüencialmente (Apêndice C), em resina epóxi EPON 812³¹ e acetona pura.

A embebição foi feita com EPON 812 puro durante 12 horas.

Todo processo de pré-embebição e embebição foi realizado no Roto Torque Heavy Duty Rotator, modelo 7637-01³².

Para a inclusão dos espécimes foram utilizados moldes siliconados³³, para que as amostras fossem devidamente orientadas.

A polimerização da resina foi efetuada em estufa³⁴ calibrada em 60 °C, por 72 horas. Os blocos foram então trimados, em aparelho Piramitome³⁵.

Os cortes semifinos foram realizados em ultramicrótomo³⁶, sendo utilizada navalha de diamante³⁷, com espessura de 800 nm. Os mesmos foram posteriormente corados com solução aquosa de toluidina a 1% e, seqüencialmente, com fucsina 0,1% e tetraborato de sódio 0,065%, na proporção de 1:1.

Nos animais do grupo experimental 2, não foi possível realizar o corte semifino, devido à ínfima quantidade de material obtido. Assim, nesse grupo,

²⁹ Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EUA

³⁰ Nuclear, Diadema, SP, Brasil

³¹ Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EUA

³² Cole-Parmer®, Vernon Hills, Illinois, EUA

³³ Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil

³⁴ Biomatic, Porto Alegre, RS, Brasil

³⁵ Leica em Trim, São Paulo, SP, Brasil

³⁶ Leica Ultracut UCT, São Paulo, SP, Brasil

³⁷ Drukker type histo 8 mm, SH Cuijk, Netherlands

realizaram-se, diretamente, os cortes ultrafinos. Estes foram confeccionados numa espessura de 100 nm, no mesmo ultramicrotomo, com navalha de diamante³⁸. Para a contrastação dos referidos cortes, empregou-se o método de Reynolds (1963), ou seja, utilizou-se solução aquosa de uranila 2% e, após, citrato de chumbo.

De cada animal, foram examinadas três telas que continham cerca de 25 cortes em cada uma. A aquisição das eletromicrografias foi realizada em microscópio eletrônico³⁹, operando com 80 kV.

Foram obtidas eletromicrografias de dez fibroblastos de cada grupo, em aumentos de 6300 e 10000 vezes. As mesmas foram feitas em negativos⁴⁰ 6,5 x 9,0 cm, que posteriormente foram revelados por 1 minuto, lavados em água, fixados durante 10 minutos e novamente lavados em água corrente adicionada com Photo Flo-200⁴¹.

Concluída a secagem dos negativos, as imagens foram digitalizadas em *scanner*⁴², com uma resolução de 600 dpi.

Um observador senior em MET analisou as imagens obtidas, particularizando alterações nucleares semelhantes àquelas evidenciadas em MO, nos cortes histológicos corados com HE.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

O Teste de Coeficiente Kappa foi empregado para a verificação do grau de concordância intraexaminador nas avaliações histológicas, para as variáveis alteração nuclear e hialinização da matriz.

³⁸ Drukker type ultra 3 mm, SH Cuijk, Netherlands

³⁹ Phillips EM208S, Eindhoven, Netherlands

⁴⁰ Kodak Electron Image Film SO – 163, Rochester, NY, EUA

⁴¹ Kodak, São José dos Campos, SP, Brasil

⁴² Scanner Epson Perfection 3170 Photo, Modelo J161A, Nagano, Ken, Japão

O Teste Não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado para a análise de diferença entre os grupos estudados, para as variáveis alteração nuclear e hialinização da matriz. Quando da presença de diferença estatística entre os grupos, o Teste de Comparações Múltiplas, ao nível de significância de 5%, foi utilizado.

A Análise de Variância, ao nível de significância de 5%, foi empregada para a verificação de diferença entre os grupos, quanto ao percentual médio de colágeno, valendo-se do *software* SPSS versão 8.0.

5 RESULTADOS

Ao final do período experimental de cada grupo, foi possível observar que o tratamento radioterápico provocou uma redução do peso médio dos animais dos grupos 1 e 2 (Tabela 1).

Tabela 1 – Peso médio (g) inicial e final dos animais dos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.

Grupo	Peso médio (g)		n	
	Inicial	Final	Inicial	Final
1	271,3	230,6	15	15
2	256,2	251,4	15	14
3	260,1	278,0	07	07
4	262,3	295,6	08	08

Fonte: Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

Durante a realização do esquema terapêutico, não houve morte de animais nos grupos estudados. Um animal do grupo 2 morreu durante o intervalo de 30 dias, tempo de espera entre o final da radioterapia e a eutanásia dos animais deste grupo.

Os animais submetidos à radioterapia na região de cabeça apresentavam-se com aparência debilitada durante o tratamento. Alguns deles demonstravam epilação, ou seja, redução visível da quantidade de pêlos na cabeça, ou seja, na área do portal da radiação. Este fato foi mais claramente percebido nos animais do grupo 2, que foram mantidos até 30 dias após a conclusão da radioterapia (Figura 6).

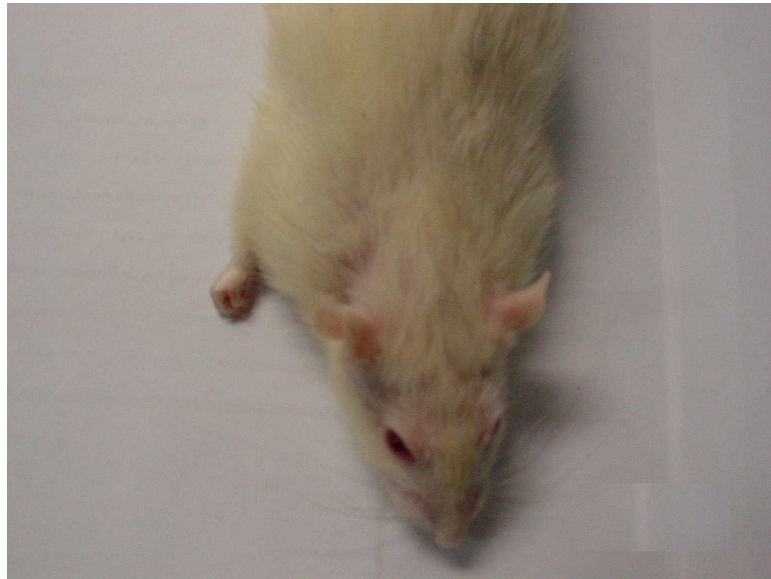


Figura 6 – Aspecto clínico de animal do grupo 2 demonstrando acentuada epilação na região da cabeça.

5.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ESPÉCIMES

5.1.1 *Avaliação dos espécimes corados com HE*

5.1.1.1 Processo inflamatório

Em todos os grupos estudados, houve ausência de alterações inflamatórias no tecido pulpar (Apêndice D). A análise da polpa coronária dos espécimes revelou a presença de um tecido conjuntivo frouxo sem alterações inflamatórias, sendo mantida a organização arquitetônica tecidual pulpar normal (Figuras 7 a 15).

5.1.1.2 Alteração nuclear

O grau de concordância intra-observador, entre a primeira e a segunda avaliação, quanto à presença e extensão de alteração nuclear em polpa coronária de dentes de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles, apresentou um coeficiente Kappa = 0,769, havendo um percentual de concordância de 86,1% (Apêndice E). Os escores conferidos para cada animal estão discriminados no Apêndice F.

O Teste Não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo Teste de Comparações Múltiplas, ao nível de significância de 5%, revelou que os grupos experimentais, ou seja, grupos 1 e 2, não diferiram entre si. No entanto, apresentaram níveis de alteração nuclear significativamente maior do que os grupos controles, ou seja, grupos 3 e 4 (Tabela 2).

Tabela 2 - Presença e extensão de alteração nuclear em polpas coronárias de molares de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.

Níveis de alteração nuclear	Grupo			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Ausente	6	-	7	5
Presente em quantidade moderada de células	1	7	-	-
Presente na maioria das células	7	3	-	-
Total	14*	10*	07	05*
Rank Médio	21,43 ^A	25,20 ^A	9,5 ^B	9,5 ^B

Fonte: Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS

* 1, 4 e 3 espécimes foram perdidos durante o processamento histológico, dos grupos 1, 2 e 4, respectivamente.

Nota: Ranks médios seguidos de letras distintas diferem significativamente, através do Teste Não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo Teste de Comparações Múltiplas, ao nível de significância de 5%.

O núcleo de algumas células pulpare dos animais expostos à radiação apresentava uma alteração que se assemelhava a um vacúolo ou bolha, ou a uma

região esférica fracamente corada, que ocupava, em alguns casos, grande parte de sua área (Figura 7), estando presente tanto nos fibroblastos, quanto nos odontoblastos (Figura 8) da porção coronária pulpar do dente molar. No entanto, apesar de não ser estatisticamente significativa, essa alteração foi mais expressiva nos animais do grupo 1 do que nos do grupo 2. Nos animais do grupo 1, a alteração era extensa e, na maioria das vezes, única (Figura 9). Já no grupo 2, tinha-se a impressão de que múltiplas e discretas alterações ou diminutos vacúolos ou bolhas preenchiam o núcleo celular (Figura 10), sendo essas menos expressivas do que as visualizadas no grupo 1. Determinadas células alteradas pareciam possuir um volume nuclear maior do que as células normais.

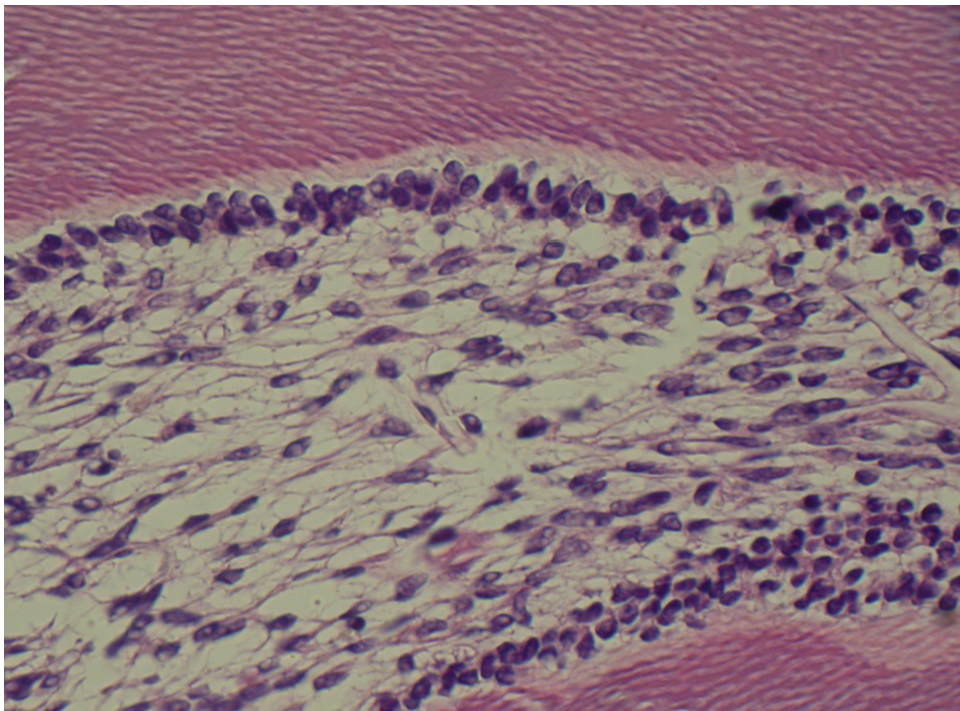


Figura 7 – Fotomicrografia mostrando polpa coronária de animal do grupo 1, com ausência de processo inflamatório, alteração nuclear grau 3, ocupando grande parte de sua área. HE. Aumento: 400X.

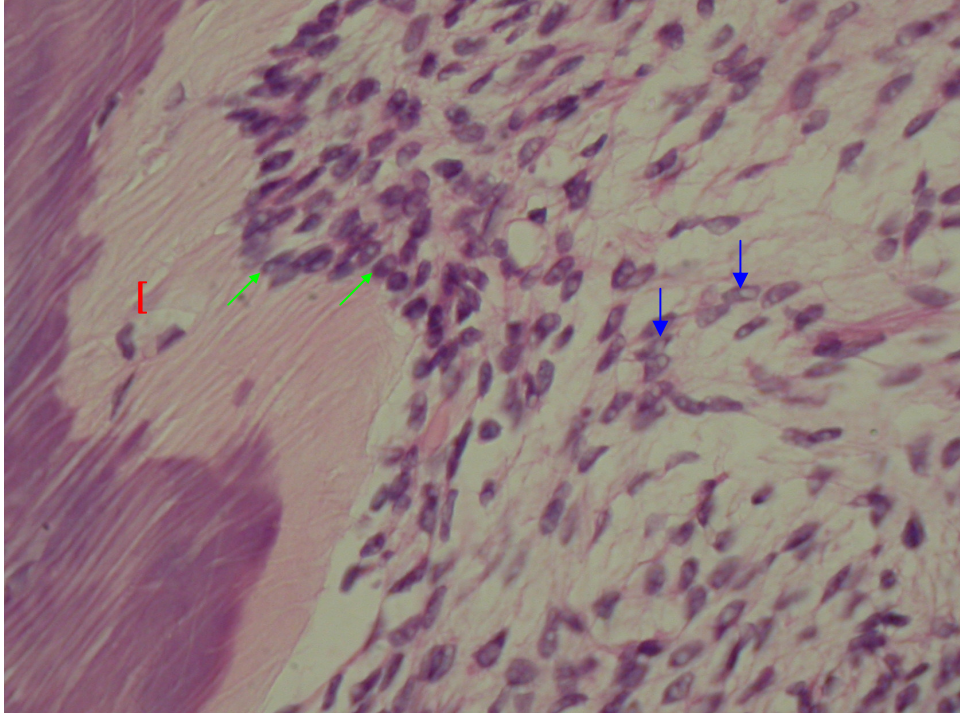


Figura 8 – Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1. As setas verdes demonstram a presença de alteração nuclear nos odontoblastos e, as azuis, nos fibroblastos pulpares. Observar a formação de osteodentina (I). HE. Aumento: 400 X.

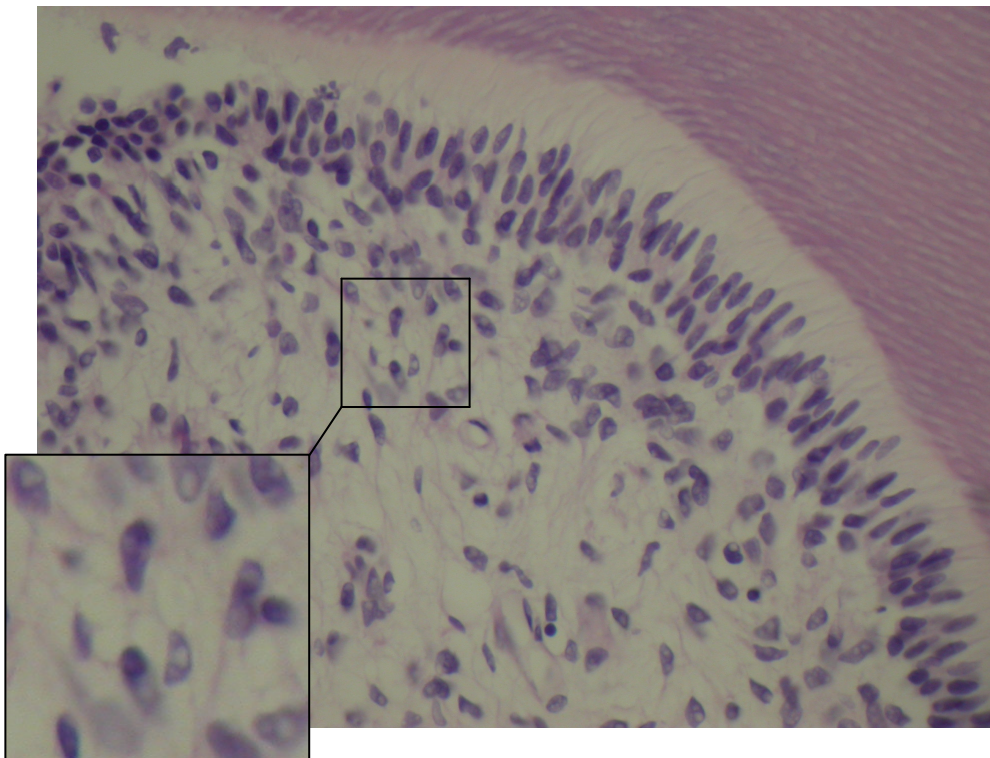


Figura 9 – Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1. A região em destaque revela a presença de alteração nuclear expressiva nas células, assemelhando-se a extensos vacúolos ou bolhas. HE. Aumento: 400 X.

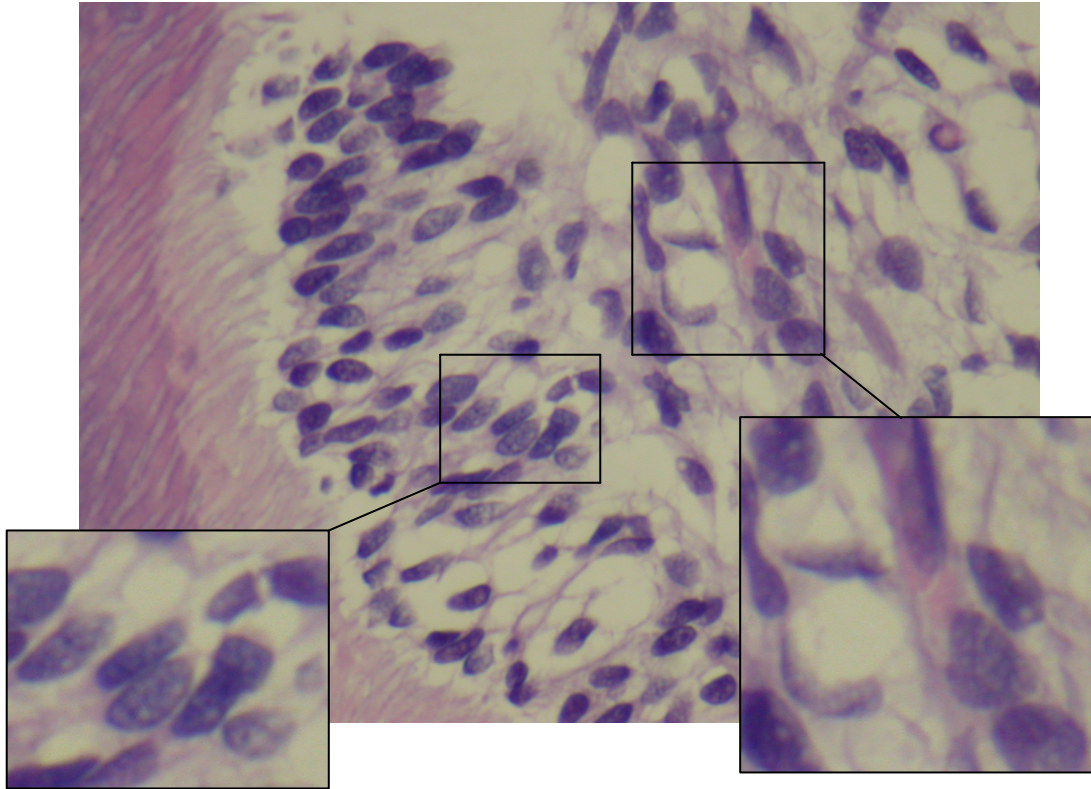


Figura 10 – Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 2. As regiões em destaque apresentam células com alterações nucleares discretas, assemelhando-se a diminutos vacúolos ou bolhas. HE. Aumento: 400 X.

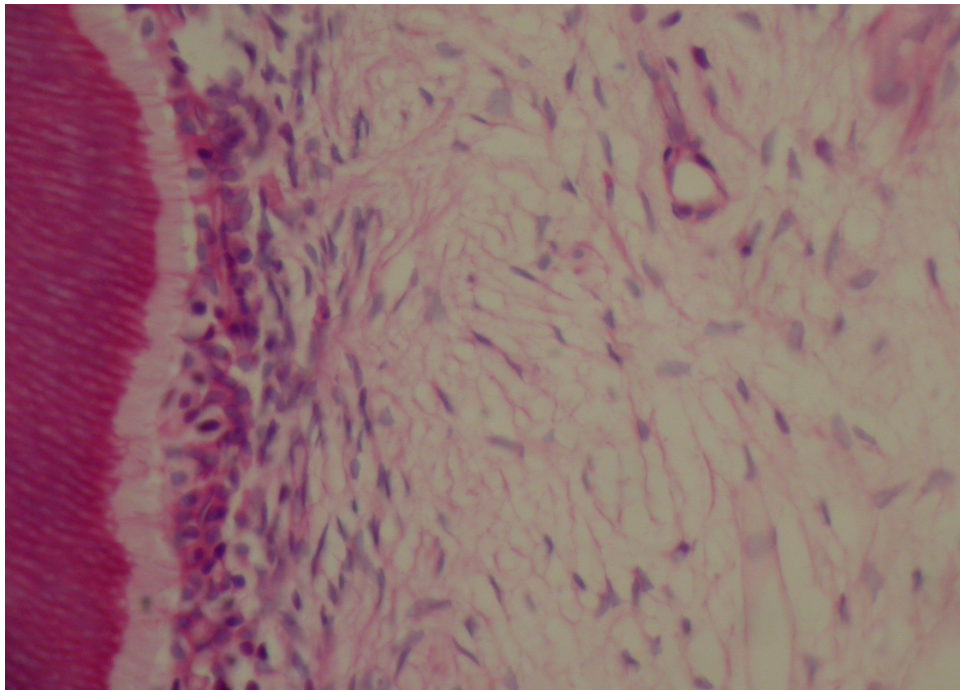


Figura 11 – Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 4. Observar a ausência de alteração nuclear e a presença de núcleos palidamente corados. HE. Aumento: 400 X.

O núcleo dos fibroblastos e odontoblastos dos animais dos grupos 3 e 4, ou seja, dos grupos controles, não exibiram qualquer tipo de alteração, apresentando-se, em muitos casos, mais palidamente corados do que os dos grupos experimentais (Figura 11).

5.1.1.3 Hialinização da matriz

Os escores, quanto ao nível de hialinização da matriz conferidos para cada espécime, encontram-se dispostos no Apêndice G.

O grau de concordância intra-observador, medido pelo coeficiente Kappa, entre a primeira e a segunda avaliação, quanto à presença e extensão de hialinização da matriz em polpa coronária de dentes de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles, foi de 0,744, havendo um percentual de concordância de 86,1% (Apêndice H).

Através do Teste Não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com $P=0,428$, verificou-se não haver diferença nos níveis de hialinização da matriz em relação aos grupos estudados (Tabela 3). Os animais dos grupos experimentais e controles demonstraram, na porção da polpa coronária do molar estudado, tanto graus de hialinização extensa (Figuras 12 e 13) quanto focal da matriz (Figura 14).

Tabela 3 – Níveis de hialinização da matriz em polpas coronárias de molares de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.

Níveis de hialinização da matriz	Grupo			
	G1	G2	G3	G4
Ausente	-	-	-	-
Focal	8	4	5	4
Extensa	6	6	2	1
Total	14*	10*	07	05*
Rank Médio	18,71	21,80	16,14	14,60

Fonte: Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS

* 1, 4 e 3 espécimes foram perdidos durante o processamento histológico, dos grupos 1, 2 e 4, respectivamente.

Teste Não-paramétrico de Kruskal-Wallis: P=0,428

Em alguns animais dos grupos experimentais, foi possível identificar a formação de osteodentina (Figuras 8 e 15).

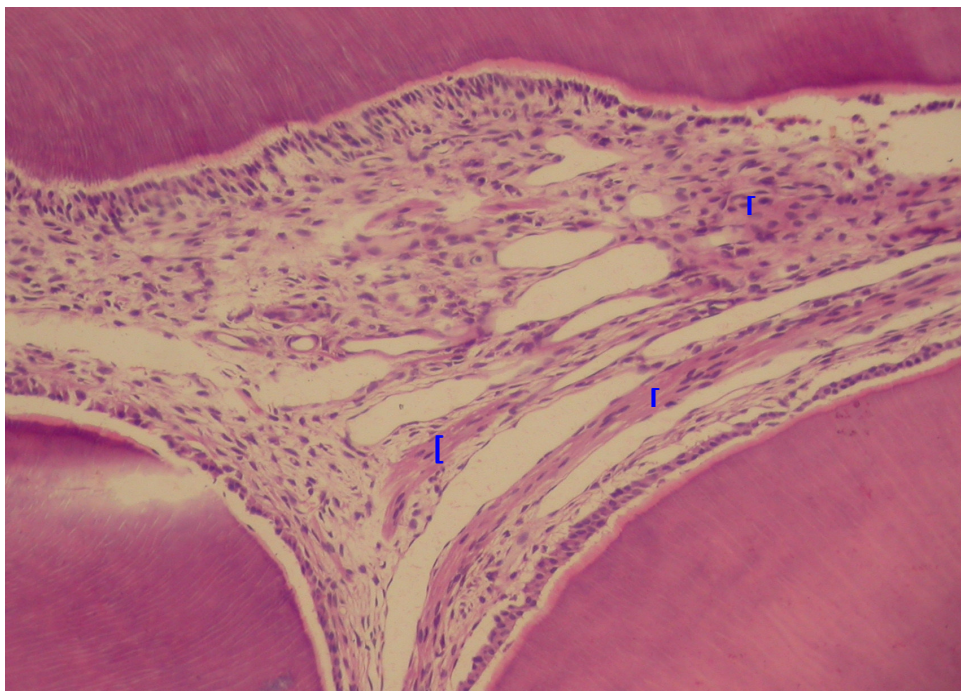


Figura 12 – Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1. Observar a extensa hialinização da matriz (I). HE. Aumento: 40X.

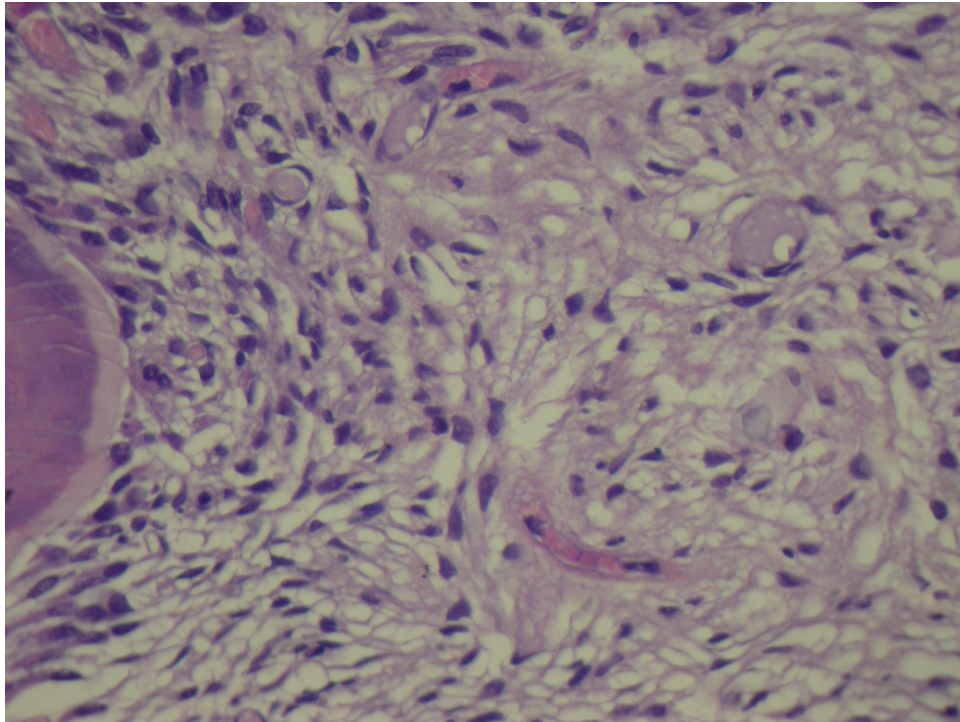


Figura 13 – Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 2, exibindo evidente hialinização da matriz. HE. Aumento: 400 X.

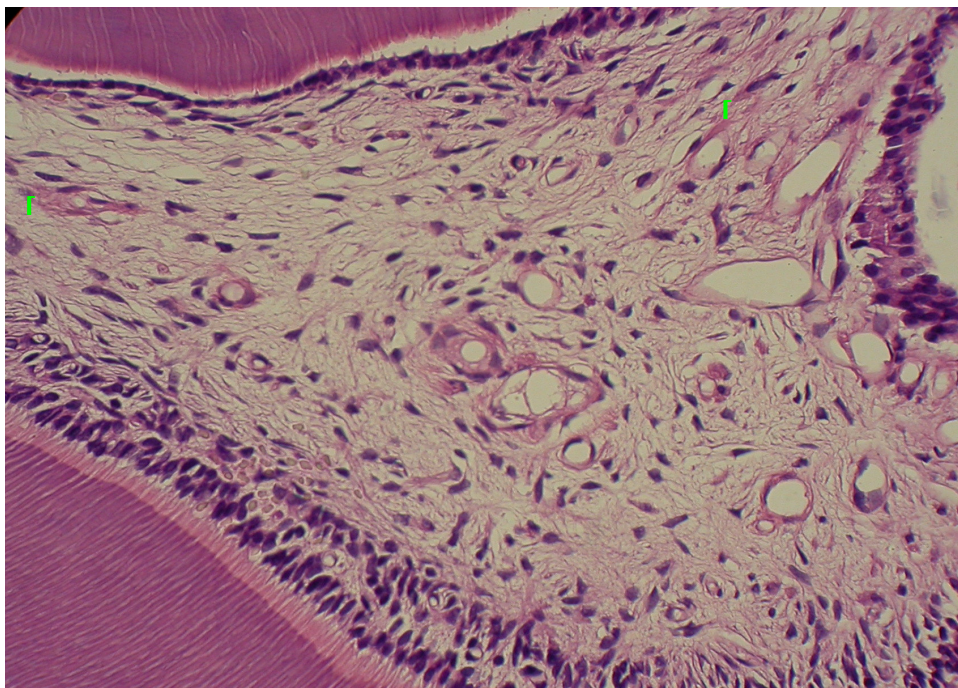


Figura 14 – Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1, apresentando áreas focais (I) de hialinização da matriz. HE. Aumento: 400X.

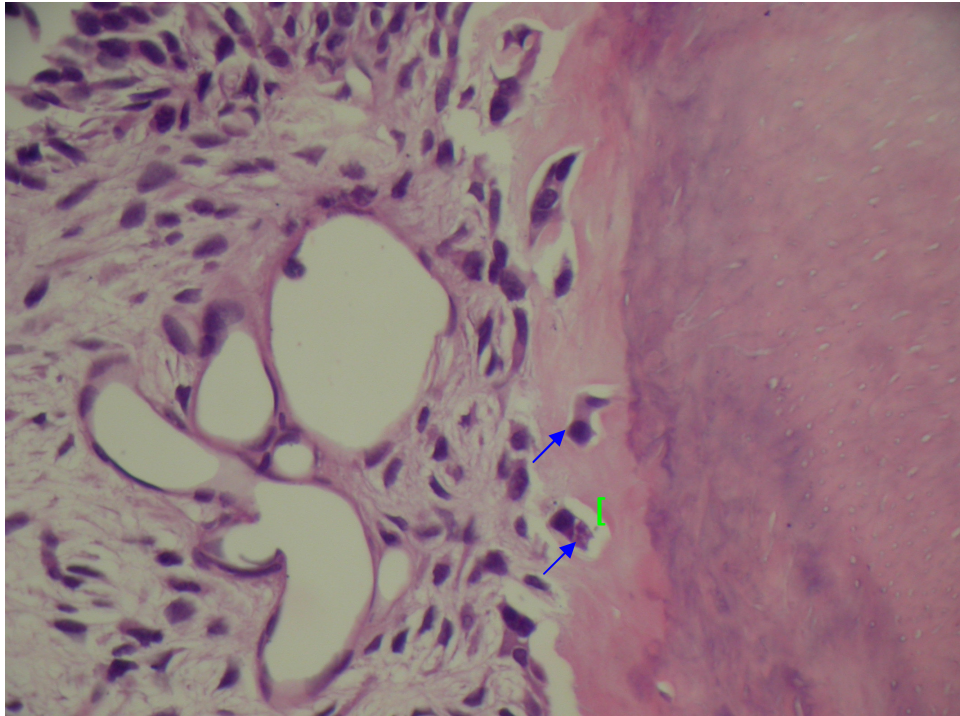


Figura 15 – Fotomicrografia de polpa coronária de animal do grupo 1 exibindo a presença de formação de osteodentina (I). As setas demonstram odontoblastos aprisionados na matriz orgânica de dentina. HE. Aumento: 400 X.

5.1.2 Avaliação morfométrica dos espécimes corados com Picrossírius

O percentual médio de colágeno por amostra, nos grupos experimentais e controles, está discriminado no Apêndice I.

Tabela 4 – Percentual médio de colágeno em polpas coronárias de molares de ratos coradas com Picrossírius, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.

Grupo	N	Percentual de colágeno			
		Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
G1	13*	28,33	12,36	14,50	51,15
G2	09*	47,23	19,45	14,21	79,90
G3	07	35,47	9,74	24,83	49,41
G4	06*	39,09	21,14	15,49	70,84

Fonte: Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS

* 2, 4 e 2 espécimes foram perdidos durante o processamento histológico, dos grupos 1, 2 e 4, respectivamente.

Tabela 5 - Tabela da Análise de Variância do percentual médio de colágeno em polpas coronárias de molares de ratos coradas com Picrossírius. Porto Alegre, 2005.

Causa de Variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrado	F	P
Grupo	3	1952.40	2.63	0.067
Erro Experimental	31	7663.13		
Total Corrigido	34	9615.53		

Fonte: Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS

Através da Análise de Variância, com $P=0,067$, verificou-se não haver diferença significativa entre os grupos estudados, quanto ao percentual médio de colágeno (Tabelas 4 e 5), apesar da média correspondente ao Grupo 2 ter sido superior a dos demais grupos estudados.

OBS.: As fotomicrografias apresentadas anteriormente encontram-se com aumentos aproximados, em virtude dos recursos fotográficos utilizados.

5.2 AVALIAÇÃO DOS ESPÉCIMES EM MET

Os fibroblastos pulpares de todos os grupos apresentavam-se irregularmente distribuídos na substância intercelular pulpar e possuíam um núcleo central, geralmente de forma ovalada, com a cromatina mais condensada na periferia. Algumas organelas como mitocôndrias, CG, RER escasso e vesículas secretoras estavam irregularmente distribuídas no citoplasma. Geralmente os fibroblastos possuíam prolongamentos citoplasmáticos afilados nas extremidades, conferindo à célula um aspecto fusiforme.

Alguns fibroblastos da polpa do incisivo inferior dos ratos do grupo 1 apresentaram alterações, tanto no núcleo quanto no citoplasma. Essas alterações assemelhavam-se a perfurações de tamanhos variados, podendo ser circulares

(Figura 16 a), ovóides ou alongadas (Figuras 16 b,c). Essa injúria foi consistentemente observada em determinadas células pulpareas do grupo 1, estando ausente nas demais células deste mesmo grupo, assim como nas células do grupo 2 (Figuras 17 a, b, c) e 3 (Figuras 18 a, b, c). Além disso, nas células do grupo 1, a cromatina apresentava-se mais condensada na periferia nuclear. Na Figura 16 b, além da condensação da cromatina, percebem-se áreas de interrupção da carioteca.

Nenhuma eletromicrografia foi realizada dos fibroblastos pertencentes ao grupo 4, visto que houve falha no processamento do material pulpar do rato deste grupo. Além disso, foi obtido material para análise de exclusivamente um espécime do grupo 2.

As alterações celulares evidenciadas nas eletromicrografias de alguns fibroblastos do grupo 1 assemelhavam-se àquelas alterações percebidas em células fibroblásticas e odontoblásticas dos grupos 1 e 2, evidenciadas através da MO, nas lâminas coradas com HE.

Feixes de fibras colágenas foram visualizados exclusivamente nas adjacências de alguns fibroblastos do grupo-controle (Figuras 18 a, b, c).

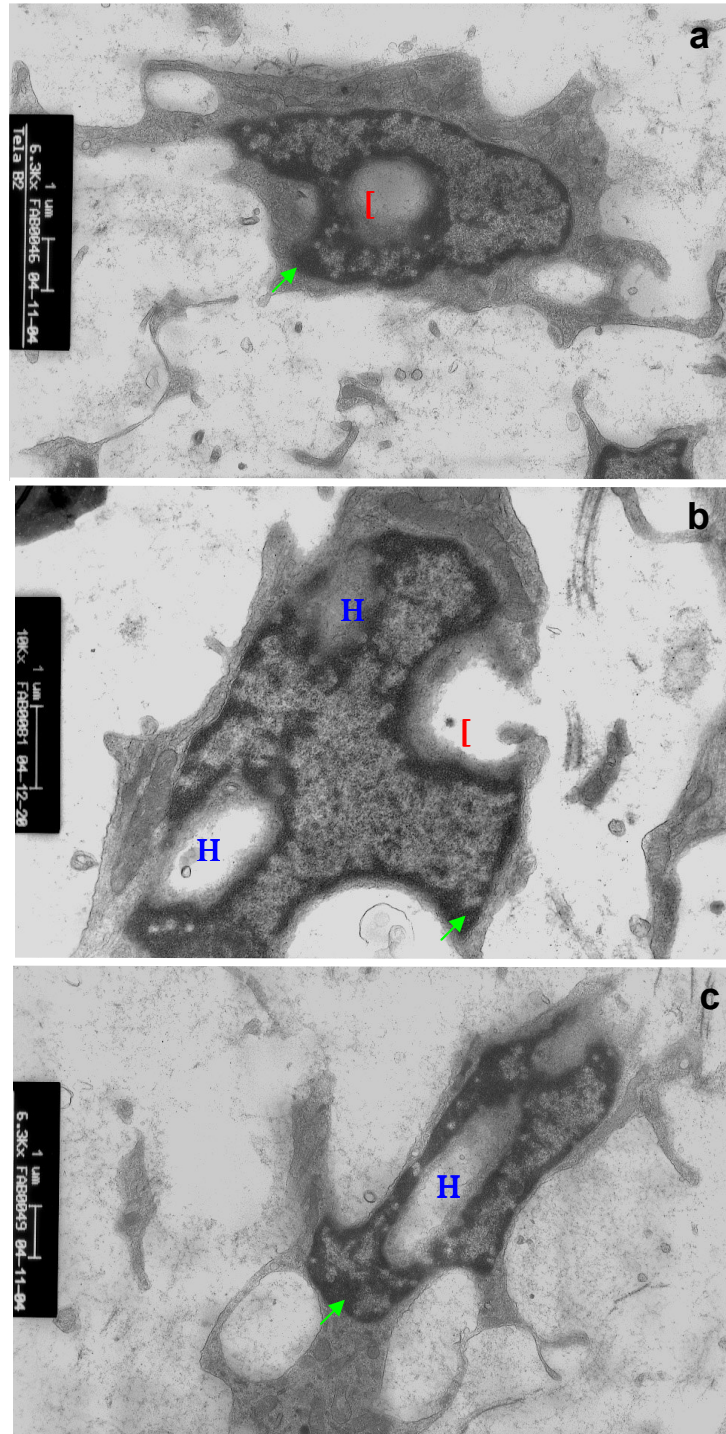


Figura 16 – Eletromicrografia de fibroblastos pulpares do grupo 1 apresentando alterações nucleares e citoplasmáticas, assemelhando-se a perfurações circulares (D), ovóides ou alongadas (H). Notar a extensa condensação da cromatina na periferia do núcleo (setas). Aumento: a, c - 6300 X; b - 10000 X.

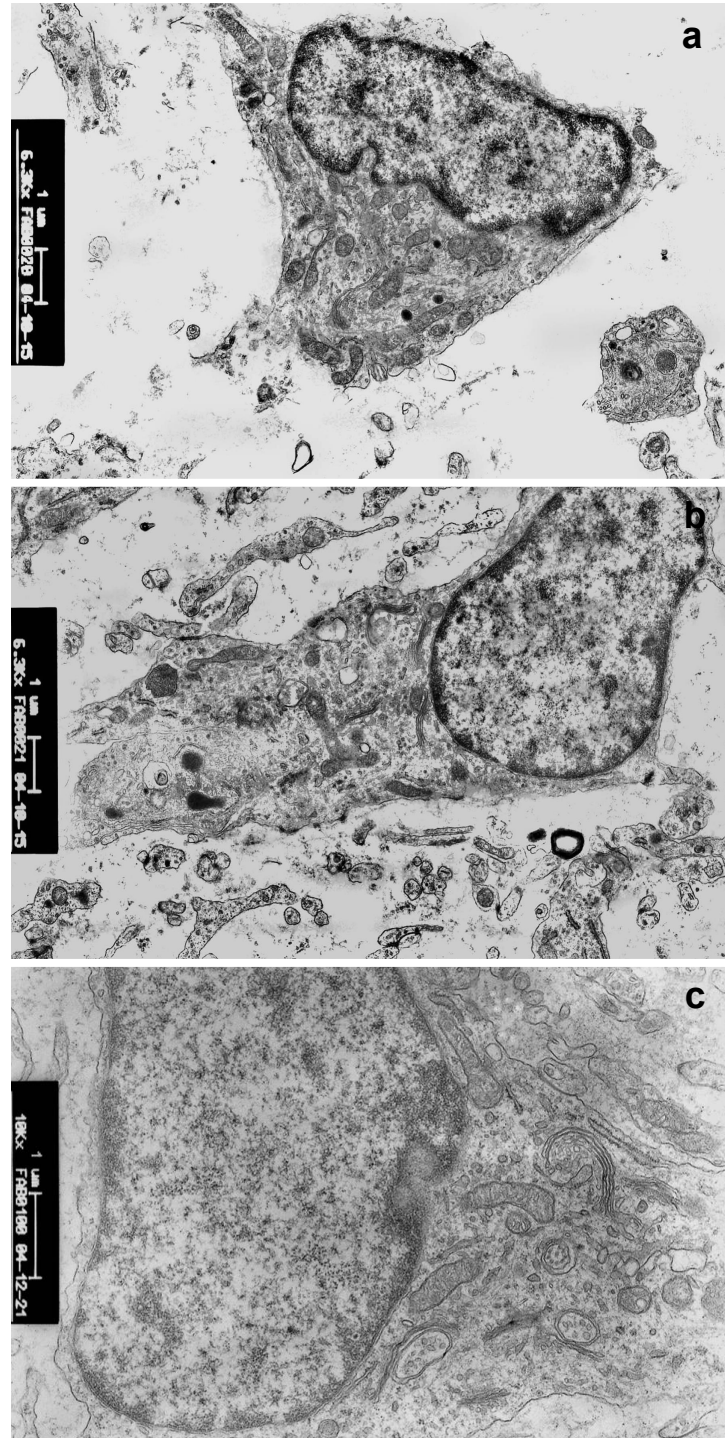


Figura 17 – Eletromicrografia de fibroblastos do grupo 2 demonstrando ausência de alterações nucleares e citoplasmáticas. Aumento: a, b - 6300 X; c - 10000 X.

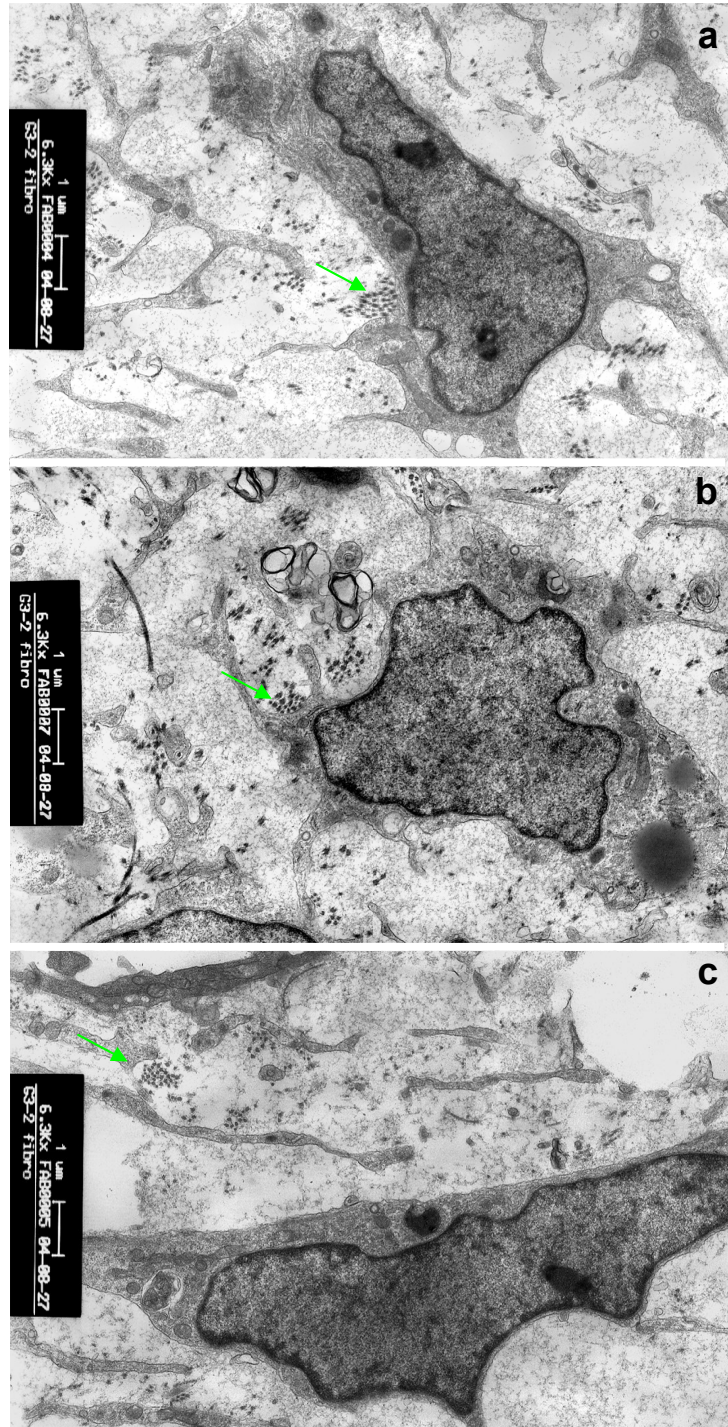


Figura 18 – Eletromicrografia de fibroblastos do grupo 3 demonstrando ausência de alterações nucleares e citoplasmáticas. Notar a presença de feixes transversais de fibras colágenas nos fibroblastos do grupo-controle (setas). Aumento: 6300 X.

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, microscopicamente, em polpas de dentes de ratos, o efeito imediato e tardio da teleterapia fracionada por Co^{60} , com o intuito de obter informações histológicas que pudessem ser extrapoladas para a prática clínica diária, na tentativa de compreender as diferentes condições pulpares apresentadas em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço. Uma vez que as publicações científicas que contemplem o efeito da irradiação no tecido pulpar são escassas, a discussão sobre algumas condutas metodológicas empregadas neste experimento parece oportuna.

Muitos animais têm sido utilizados para o estudo do efeito da irradiação nos tecidos dentários, dentre os quais o rato, o camundongo, o hamster, o porco, o porco-da-índia, o coelho, o gato, o cachorro e o macaco (KIMELDORF; JONES; CASTANERA, 1963). Analisando a literatura apresentada, é notório, no entanto, o emprego maciço do rato nesses estudos, principalmente valendo-se de seus incisivos, uma vez que estes dentes estão em erupção constante durante toda vida, havendo uma permanente proliferação e diferenciação dos odontoblastos e dos ameloblastos na sua porção basal. Nesse sentido, permite o estudo dos efeitos da irradiação nos diferentes estágios do processo formativo do dente (SMITH, 1931, 1938; STAFNE; BOWING, 1947; DALE, 1948; BRUCE; STAFNE, 1950; BURSTONE, 1950; MEDAK; SCHOUR; KLAUBER JR, 1950; ENGLISH; TULLIS, 1951; MEDAK et al., 1952; ENGLISH; SCHLACK; ELLINGER, 1954; ENGLISH, 1956; HANSEN; ENGLISH, 1957; KIMELDORF; JONES; CASTANERA., 1963). No presente estudo, que objetivou analisar o efeito da radioterapia fracionada sobre a polpa dental de dentes completamente formados ou com rizogênese completa, visto ser esta a realidade da maioria dos pacientes oncológicos, este animal foi escolhido

em função de seu pequeno porte, por produzir menos ruídos sonoros, se comparados com animais maiores, e pela facilidade de transitar com o mesmo nas dependências de um hospital, local de realização da radioterapia. Assim, o tecido pulpar analisado histologicamente correspondeu à porção coronária dos dentes molares, ou seja, de dentes de crescimento limitado. Inicialmente, a MET também seria realizada nesse mesmo dente. No entanto, pela dificuldade de extração de significativa porção de polpa no molar, o terço médio pulpar do incisivo foi selecionado para esse fim.

Uma preocupação presente, durante o projeto piloto deste experimento, foi a necessidade ou não da realização de anestesia nos animais, durante as sessões de radioterapia, para que os mesmos mantivessem suas cabeças voltadas para a área da radiação. No entanto, ao mesmo tempo em que o procedimento anestésico ajudaria na apreensão e deslocamento dos ratos, o número elevado de aplicações poderia favorecer a sua morte (NATHANSON; BÄCKSTRÖN, 1978). Com isto, haveria uma redução no tamanho da amostra, em função do protocolo estabelecido contemplar 30 sessões de radioterapia. A radioterapia fracionada vem sendo utilizada em muitos estudos empregando-se animais (CARL et al. 1990; WÜRSCHMIDT et al., 1992; KLEINEIDAM; PIECONKA; BECK-BORNHOLDT, 1994; CELEN et al., 2001), sem o uso da anestesia durante as sessões de tratamento. Por outro lado, os estudos de Hutton et al. (1974), Nickens et al. (1977), Matson et al. (1978), Rohrer et al. (1979) realizados em macacos, empregaram um protocolo no qual o procedimento anestésico foi realizado a cada dose de irradiação. Mesmo os trabalhos de Sweeney; Elzay; Levitt (1977), Zywiets; Hahn; Lierse (1994) e Sagowski et al. (2002, 2004), utilizando o rato como modelo animal, são partícipes dessa metodologia.

Rohrer et al. (1979), em seus estudos em macacos, pareceram se preocupar com a dose anestésica a cada sessão de radioterapia. Por isso, optaram por aumentar a dose radioativa diária e diminuir o tempo radioterápico, acreditando que essa conduta resultaria nos mesmos efeitos biológicos do protocolo rotineiramente usado em humanos. Para os autores, a combinação de anestésias freqüentes e os efeitos prolongados de radiação resultariam em mortes excessivas durante a fase da radioterapia.

English; Schlack; Ellinger (1954), apesar de empregarem uma dose única de 15 Gy de radiação X em ratos, foram um dos primeiros autores a descrever a forma de imobilização dos animais durante a radioterapia, dispensando o procedimento anestésico. Naquela ocasião, os animais foram colocados no interior de tubos cilíndricos, onde, na extremidade anterior, um orifício de um a 1,5 cm de diâmetro foi feito, para permitir a inserção do nariz do animal. Após a entrada do animal no tubo, uma tampa de borracha era colocada em sua extremidade posterior, a qual possuía um orifício para permitir a saída do rabo. A metodologia empregada por esses autores e por English (1956) serviu de modelo para a idealização das garrafas plásticas de água mineral, utilizadas na apreensão dos animais deste estudo, eliminando a necessidade do uso de anestesia para a realização das sessões de radioterapia. No entanto, diferentemente dos autores citados acima, o aparato desenvolvido nesse experimento possibilitou a saída de toda a cabeça do animal pelo orifício anterior da garrafa, facilitando a disposição dessa região no interior do campo de radiação.

Já Adkins (1967) idealizou um aparato para imobilização dos animais de seu experimento, que prevenia a retirada de suas cabeças do campo primário da irradiação, protegendo os seus corpos com lâminas de chumbo, procedimento

também descrito por Karadzov et al. (1985), fato último não realizado no presente experimento, em função das características de colimação do aparelho de radioterapia empregado. Mais recentemente, Carl et al. (1990), Würschmidt et al. (1992) e Kleineidam; Pieconka; Beck-Bornholdt (1994) empregaram um aparato denominado “jig”, para a irradiação de um local em particular do rato, relatando que geralmente os animais entravam no “jig” livremente, não demonstrando sinais de estresse.

Por outro lado, Sweeney; Elzay; Levitt (1977) dispuseram seus modelos animais em formato de roda de carreta sobre a mesa do aparelho de radioterapia, em posição supina, sendo os mesmos mantidos com bandas de borracha dispostas nas pernas e nos dentes superiores anteriores. Nesse caso, os animais foram previamente anestesiados.

Foi preocupação constante, durante o desenvolvimento do projeto metodológico desse estudo, a aproximação do desenho experimental com a realidade clínica. Assim, objetivou-se empregar, no modelo animal, a mesma dose radioterápica empregada no protocolo para tratamento de neoplasias bucais em humanos (REGEZI; SCIUBA, 2000). No entanto, havia a dúvida se o rato, em função de seu menor volume corporal em relação ao paciente oncológico, suportaria a dose radioterápica empregada comumente nesse último. Porém, analisando a literatura vigente, percebeu-se que doses de pelo menos 60 Gy vêm sendo utilizadas, de forma fracionada, em ratos, empregando diferentes modalidades de tratamento, como a radiação X (CARL et al., 1990; WÜRSCHMIDT et al., 1992; KLEINEIDAM; PIECONKA; BECK-BORNHOLDT, 1994), o Co^{60} (ZYWIETZ; HAHN; LIERSE, 1994; SAGOWSKI et al., 2002, 2004) e o acelerador linear (CEELEN et al., 2001). No presente experimento, foi empregado o mesmo protocolo radioterápico descrito por

Sagowski et al. (2002, 2004), qual seja, 30 sessões de 2 Gy valendo-se do Co^{60} , totalizando 60 Gy, fracionadas no período de 6 semanas, de segundas a sextas-feiras, que, em última análise, é o esquema de radioterapia empregado para o tratamento do câncer bucal em humanos. Além disso, os poucos trabalhos referentes ao estudo do dano pulpar causado pela radioterapia (HUTTON et al., 1974; NICKENS et al., 1977) e da influência da mesma na resposta ao tratamento endodôntico (MATSON et al., 1978) valeram-se também do emprego do Co^{60} , porém não em ratos e sim em macacos.

Sabendo-se que o tecido pulpar dentário é limitado por paredes rígidas de dentina, sendo esta, na porção coronária circundada por esmalte e, na radicular, por cimento, optou-se por realizar a perfusão nos animais, objetivando uma melhor fixação do tecido em análise. Acreditou-se que exclusivamente a imersão da hemimandíbula do rato na solução fixadora, sendo ela o paraformaldeído a 4% ou o glutaraldeído a 2%, não garantiria uma completa e adequada manutenção da integridade da arquitetura pulpar, visto que o acesso da solução ao tecido dar-se-ia por intermédio do diminuto forame apical ou de possíveis deltas apicais ou canais laterais, locais onde o endodonto comunica-se com o periodonto de inserção ou sustentação do dente.

O uso da perfusão para a eutanásia de animais vem sendo corroborada em muitos estudos em que a polpa é o tecido de interesse, independentemente do animal empregado ser o gato (ARWILL et al., 1973; FEHÉR; CSÁNYI; VAJDA, 1977), o rato (SALOMON; SEPTIER; GOLDBERG, 1991; SATO et al., 1992, YOSHIDA; OHSHIMA, 1996) ou o cão (HIGASHI; OKAMOTO, 1996a,b). Neste particular, é oportuno salientar que este tipo de conduta não causa qualquer sofrimento ao animal, visto que previamente à perfusão, o mesmo é devidamente

anestesiado. Além disso, o emprego do paraformaldeído a 4% como solução fixadora nos espécimes estudados através da MO, em detrimento do formol a 10%, solução amplamente difundida e aceita para a conservação tecidual, foi devido à disponibilidade daquele no Laboratório de Neuroanatomia, DCM, ICBS da UFRGS e pelo fato da mesma ser uma solução mais refinada, adequando-se ao propósito do estudo. Essa substância foi empregada para perfusão em ratos, no estudo de capilares periféricos da polpa dental, pela técnica da corrosão, seguido da injeção de resina Mercocox nos animais (YOSHIDA; OHSHIMA, 1996). Por outro lado, é notório mencionar que a utilização do glutaraldeído a 2% em todos os espécimes estudados acarretaria elevação dos custos do experimento. Assim, optou-se pelo emprego dessa última solução exclusivamente naqueles destinados à MET, seguindo o protocolo de preparo de materiais biológicos do CMM da ULBRA, Canoas, RS.

O emprego do EDTA, para a descalcificação dos espécimes destinados à avaliação em MO, está alicerçado nos trabalhos de Salomon; Septier; Goldberg (1991), Sato et al. (1992) e Yoshida; Ohshima (1996), que empregaram, em seus estudos, dentes de ratos. No entanto, cabe salientar que Yoshida; Ohshima (1996) citaram um tempo de exclusivamente três semanas para a descalcificação de seus espécimes em EDTA a 5%. No presente experimento, que utilizou o EDTA a 17%, foi necessário um período de aproximadamente cinco meses para a ocorrência completa do processo de descalcificação, mesmo a solução sendo renovada duas vezes por semana e os espécimes mantidos sob agitação constante, a uma temperatura de 44°C.

Poucos estudos em MET vêm sendo realizados no tecido pulpar devido aos problemas técnicos relacionados ao acesso, principalmente, à porção periférica da polpa (SÁNCHEZ-OSORIO, 1978; SÁNCHEZ-OSORIO et al., 1988). Apesar da zona

odontoblástica não ter sido o objetivo de estudo neste experimento, e sim, a zona central da polpa dentária, onde se localizam os fibroblastos, foi marcante a dificuldade de obtenção de quantidade suficiente de tecido pulpar nos dentes molares dos ratos. Portanto, optou-se por estudar os efeitos da irradiação sobre fibroblastos pulpares, através da MET, valendo-se da porção média do incisivo inferior, seguindo a metodologia descrita por Murray et al. (2002) para obtenção deste tecido, pelo fato desse dente possuir maior volume pulpar, quando comparado ao dente molar. A clivagem de dentes, mediante a confecção prévia de sulcos radiculares longitudinais para a obtenção do tecido pulpar, é amplamente mencionada na literatura, sendo esta executada imediatamente após a exodontia dos elementos em estudo em humanos (SÁNCHEZ-OSORIO, 1978; READER; FOREMAN, 1981; COUVE, 1986; SÁNCHEZ-OSORIO et al., 1988; BARROS; BOZZO; GREGÓRIO, 1994; OKAMURA et al., 1994), em cão (HIGASHI; OKAMOTO, 1996a,b) e em macacos (KRELL; McMURTREY; WALTON, 1994), o que permite a rápida fixação do tecido pulpar (COUVE, 1986). Essa manobra dispensa a realização da perfusão, uma vez que o tempo entre a exodontia e a obtenção do fragmento pulpar é pequeno, não sendo necessária a dissecação da mandíbula e, posteriormente, do tecido ósseo ao redor do dente, como realizado no presente estudo. Em função do diminuto volume pulpar dos molares do rato, a clivagem desses dentes, associada à exodontia prévia dos mesmos é de execução técnica extremamente difícil. Por isso, a perfusão e a posterior descalcificação dos espécimes fez parte da metodologia desta pesquisa.

Parece ser consenso na literatura, que o tratamento radioterápico leva a uma diminuição do peso, ou, pelo menos, em um ganho mais lento do mesmo em animais irradiados, quando comparados aos do grupo-controle. Este fato foi percebido no

presente estudo, sendo corroborado por English; Schlack; Ellinger (1954), Greulich; Ershoff (1961), Nathanson; Bäckström (1978), Rohrer et al. (1979), Karadzov et al. (1985), Ceelen et al. (2001) e Sagowski et al. (2004), que empregaram diferentes modelos animais, dentre os quais o rato, o camundongo, o coelho e o macaco.

A epilação evidenciada nos animais submetidos à radioterapia foi marcante neste experimento, sendo mais expressiva na medida em que a dose acumulada de radiação e o tempo aumentavam. English; Schlack; Ellinger (1954) relataram haver alopecia nos animais de seus estudos, sendo esta percebida duas a quatro semanas após a exposição, e localizada, principalmente, ao redor do nariz e no topo da cabeça, regiões também afetadas nos modelos animais deste trabalho e mencionada nos estudos de Gowgiel (1960), Meyer; Shklar; Turner (1962), Hutton et al. (1974), Nickens et al. (1977) e Rohrer et al. (1979).

Em citações literárias da década de 60, de pesquisas que estudaram o efeito da irradiação nos tecidos valendo-se de ratos, a morte de muitos modelos animais foi evidenciada, principalmente quando a modalidade radioterápica empregada era o raio X. Isto foi justificado porque a radiação era dispensada nos limites da ortovoltagem, de forma localizada ou em todo o corpo do animal (BURSTONE, 1950; MEDAK; SCHOUR; KLAUBER JR., 1950; ENGLISH; TULLIS, 1951; DALE, 1953; ENGLISH; SCHLACK; ELLINGER, 1954; HANSEN; ENGLISH, 1957). No presente estudo, exclusivamente um rato do grupo 2 morreu, no transcorrer do período de espera entre o final da teleterapia e o dia da eutanásia dos animais. No entanto, muitas amostras foram perdidas durante o processamento histopatológico, devido à dificuldade de obtenção de área pulpar suficiente para análise, em função do diminuto tamanho dos dentes molares do modelo animal e pela localização própria do tecido pulpar, que se apresenta rodeado por um tecido duro, a dentina. Este foi o

motivo pelo qual exclusivamente um molar de cada espécime foi analisado, sendo escolhido aquele que, na lâmina histológica, apresentasse a maior área correspondente ao tecido pulpar.

A comparação entre os resultados deste experimento com outros torna-se difícil, em decorrência do pequeno número de trabalhos experimentais descritos na literatura abordando o efeito da irradiação no tecido pulpar. Hutton et al. (1974) e Nickens et al. (1977) não encontraram, em MO, alterações discerníveis na polpa de macacos irradiados com Co^{60} , na dose de até 70 e 76 Gy, respectivamente, avaliando períodos experimentais semelhantes aos descritos neste experimento. Nesse particular, cabe ressaltar que o número de animais destes estudos era reduzido, tratando-se exclusivamente de dois e um macaco irradiados, respectivamente, nos trabalhos de Hutton et al. (1974) e de Nickens et al. (1977). Dessa forma, logo após o término da radioterapia e decorrido um mês da conclusão da mesma, Hutton et al. (1974) avaliaram quatro dentes, sendo dois de cada animal. Já no último período experimental, ou seja, dois meses após a conclusão da radioterapia, os autores estudaram três espécimes, sendo todos pertencentes ao mesmo macaco. Outro fato que deve ser considerado é que as polpas dentárias desses animais, em ambos os estudos mencionados, foram coradas em HE e analisadas, histologicamente em pequenos aumentos, como o de 35 vezes (NICKENS et al., 1977) e 80 vezes (HUTTON et al., 1974). Assim, possíveis alterações nucleares presentes em células fibroblásticas e odontoblásticas, como as evidenciadas no presente estudo, poderiam ter passado despercebidas. Por outro lado, concorda-se com os resultados de Hutton et al. (1974) e de Nickens et al. (1977), quanto à descrição de ausência de processo inflamatório nos espécimes estudados, fato também encontrado nesta pesquisa. Apesar da radiação ionizante

provocar inflamação em muitos tecidos, como a mucosa oral, não foi perceptível nenhum tipo de resposta inflamatória no tecido pulpar, mediante a metodologia empregada. O dano causado pela radiação pareceu ser mais celular do que o de suscitar uma reação de cunho inflamatório.

Um grande número de células odontoblásticas e fibroblásticas pulpares nos animais dos grupos experimentais apresentaram alterações nucleares caracterizadas como regiões fracamente coradas, assemelhando-se a bolhas ou vacúolos intranucleares, que ocupavam grande parte da área nobre celular, sede do DNA, onde se concentram as informações do código genético. Silverman; Sheline (1961) descreveram que células epiteliais da cavidade bucal, quando irradiadas e obtidas por esfregaço, podem apresentar rugosidades nucleares periféricas ou aberrações da cromatina. Mettler Jr; Upton (1995) citaram que células expostas à radiação ionizante apresentam alterações morfológicas, como edema e agrupamento da cromatina no núcleo, podendo este último tornar-se denso e desfigurado. Poder-se-ia pensar, baseado nas considerações desses autores, que as células pulpares irradiadas no presente estudo tiveram um grupamento tal da cromatina, que parte do volume nuclear ficou completamente isento desse componente, transparecendo, em MO, como regiões fracamente coradas ou como vacúolos ou bolhas intranucleares. Outro fato seria a possibilidade da irradiação causar edema no núcleo, pressionando o material genético para a periferia, conferindo ao mesmo um aspecto semelhante a bolhas. Por outro lado, este edema poderia ser tão intenso que aumentaria o volume nuclear, característica presente nas células estudadas por Silverman; Sheline (1961) e também observado em determinadas células deste estudo.

Também Fonkalsrud et al. (1977) evidenciaram a presença de severos transtornos nucleares em células endoteliais de artérias femurais irradiadas, que

foram denominados como crateras, sendo estas claramente perceptíveis no período de 48 horas pós-irradiação. Fato curioso, no entanto, é como os autores visualizaram essas alterações nucleares, visto que os espécimes foram estudados através da MEV, que demonstra especificamente a topografia externa da célula. Apesar disso, os resultados do estudo de Fonkalsrud et al. (1977) assemelharam-se com aqueles descritos neste experimento. Foi notória a presença de alterações mais amplas, que ocupavam praticamente toda a área nuclear nos animais do grupo 1, do que nos espécimes do grupo 2, nos quais as alterações ainda se faziam presentes. No grupo cujos animais foram irradiados e eutanasiados 30 dias após a radioterapia, as alterações eram mais discretas, como se as regiões fracamente coradas, denominadas como bolhas, vacúolos ou crateras se fragmentassem, compondo estruturas semelhantes a diminutas bolhas dispostas na superfície nuclear observada. Talvez, neste caso, com o passar do tempo, poderia haver um reagrupamento do DNA, conferindo um novo aspecto ao núcleo. Assim, os resultados deste estudo emergem a necessidade de novos experimentos nesta mesma linha de pesquisa, valendo-se de um tempo maior de avaliação. É evidente que as células pulpares modificam-se após a exposição à radioterapia. No entanto, o efeito da irradiação na polpa pode ser transitório, visto que as alterações nucleares presentes nas células pulpares do grupo 2 pareceram ser mais discretas que as do grupo 1.

O emprego da MET neste estudo possibilitou a analogia entre as alterações nucleares evidenciadas através da MO com aquelas percebidas nas eletromicrografias. Através da análise destas últimas imagens, pôde-se observar que, determinados fibroblastos dos animais pertencentes ao grupo 1, apresentaram injúrias morfológicas nucleares e citoplasmáticas, dando a impressão de que as

células haviam sofrido perfurações com diferentes aspectos, tais como circular, ovóide ou alongado, ou que tivesse ocorrido uma espécie de explosão intracelular. Com base nessas considerações, poder-se-ia imaginar que a irradiação tenha, ocasionalmente, colidido ou atravessado, em diferentes angulações, algumas células fibroblásticas. Este talvez seria o motivo pelo qual exclusivamente determinados fibroblastos demonstraram as alterações morfológicas descritas e também pela variabilidade das formas das perfurações. Por outro lado, as diferentes morfologias das mesmas poderiam estar associadas a distintos planos de corte da célula fibroblástica.

Nas eletromicrografias de alguns fibroblastos do grupo 1, foi notável a presença da condensação da cromatina na periferia do núcleo, com o desaparecimento da borda ou limite dessa estrutura. Adkins (1967) também evidenciou, na porção basal de incisivos inferiores de ratos, algumas horas após o emprego da irradiação, mudanças celulares na forma de cariorrexe. A condensação da cromatina na periferia do núcleo pode estar associada a células com pouca atividade funcional (TORNECK, 2001), em decorrência da exposição à irradiação. Com base nos resultados do presente estudo, parece que as células pulpares completamente diferenciadas e que já cumpriram seu papel formativo, localizadas no terço médio do incisivo inferior, também sofrem alterações nucleares imediatamente após a exposição à radioterapia, assim como aquelas localizadas na porção basal deste dente.

Cotran; Kumar; Collins (2000) relataram que uma célula injuriada de forma reversível pode apresentar aglomeração da cromatina nuclear, enquanto a célula com uma injúria irreversível demonstra, ultra-estruturalmente, o núcleo picnótico, cariólise ou cariorrexe. Segundo estes autores, a condensação da cromatina nuclear

pode ser uma alteração inicial tanto da apoptose quanto da necrose celular. Esta alteração foi percebida nos fibroblastos do grupo 1 deste estudo. Na apoptose, os eventos subseqüentes seriam o brotamento citoplasmático e fagocitose dos corpúsculos apoptóticos expulsos. Já na necrose, observam-se tumefação organelar e subseqüente lesão na membrana. Gajdusek et al. (2001) perceberam alterações morfológicas consistentes com apoptose e perda da viabilidade celular em endotélio aórtico exposto à irradiação, em períodos de 12 a 16 horas pós-tratamento, que correspondem, aproximadamente, ao período de eutanásia dos animais do grupo 1 deste experimento.

Em contrapartida, na avaliação através da MET, as alterações celulares provocadas pela radioterapia foram observadas tanto no núcleo quanto no citoplasma, fato último não percebido nas células irradiadas, quando examinadas na MO. Com o emprego da MO, o núcleo celular é facilmente visualizado, uma vez que o mesmo se encontra fortemente corado pela técnica histológica de rotina, enquanto o citoplasma é, muitas vezes, indistinguível, o que pode ter prejudicado a visualização de alterações nesta porção celular. Dessa forma, o emprego de diferentes metodologias para o estudo de determinada alteração parece ser importante.

Um aspecto contraditório evidenciado neste estudo encontra-se alicerçado no fato das células do grupo 2 não terem apresentado alterações morfológicas semelhantes às descritas nas do grupo 1, utilizando-se a MET, visto que, com base nas avaliações da MO, as células de ambos os grupos irradiados apresentaram alterações nucleares. Uma vez que os animais pertencentes ao grupo 2 foram eutanasiados um mês após a conclusão do esquema radioterápico, poder-se-ia especular as seguintes possibilidades: que as células do terço médio do incisivo

inferior do rato, em função do tempo, tenham conseguido reparar a injúria causada pela irradiação, ou que os fibroblastos injuriados tenham sido substituídos por outras células durante este período, já que esse dente apresenta crescimento contínuo e forame aberto, podendo possuir uma maior capacidade reacional, quando comparado com o dente molar. Outra possibilidade seria que o *turnover* celular local seja competente para recuperar as suas estruturas ou que, após apoptose ou morte celular, as células pulpares tenham sido substituídas por outras da própria região da área irradiada. Neste caso, a capacidade de regeneração da polpa seria notável.

De outra maneira, um episódio importante a salientar foi a dificuldade de se conseguir material pulpar dos animais pertencentes ao grupo 2, para a avaliação em MET, visto que a irradiação parece ter causado, visualmente, uma irregularidade e diminuição no diâmetro radicular do incisivo e conseqüentemente, da porção pulpar, nas proximidades de sua base. Em função da erupção contínua desse dente no decorrer do tempo, no momento da eutanásia dos animais do grupo 2, a porção mediana do incisivo inferior encontrava-se diminuída de tamanho. Conseqüentemente, foi possível obter um pequeno fragmento pulpar em um único animal, tanto que não foram realizados cortes semi-finos nesse espécime, passando-se de imediato para a obtenção dos ultra-finos, como mencionado no capítulo de material e métodos. Cumpre ressaltar que o bloco de resina dessa amostra foi aprofundado por três vezes, para obtenção de novas eletromicrografias, para a confirmação da inexistência de alterações nucleares e/ou citoplasmáticas nos fibroblastos desse grupo.

Apesar do tratamento radioterápico ter conferido alterações nucleares nas células pulpares dos ratos estudados, o mesmo não foi capaz de promover um aumento no grau de hialinização da matriz, como era de se esperar, nos modelos

animais do grupo 2. Mathes; Alexander (1996) relataram que tanto o aumento da fibrose quanto a diminuição da vascularização são evidenciados em tecidos submetidos à radioterapia, constituindo-se em efeitos tardios da irradiação. Pensando que a radioterapia pudesse promover um aumento da fibrose no tecido pulpar com o passar do tempo, optou-se por eutanasiar os animais em diferentes períodos experimentais. Embasado nos trabalhos de Hutton et al. (1974) e Nickens et al. (1977), o tempo de 30 dias, após a conclusão do esquema terapêutico, foi escolhido para este fim, para os animais do grupo 2 e, conseqüentemente, do grupo 4.

No entanto, os resultados deste estudo demonstraram que não há diferença no grau de hialinização da matriz, na polpa coronária de ratos irradiados e os do grupo-controle, independentemente do período de observação. Novas pesquisas são necessárias para a avaliação do efeito da irradiação no tecido pulpar, no que tange ao grau de fibrose, valendo-se de diferentes períodos de observação, iguais e superiores aos empregados neste experimento. Isto porque Stone et al. (2003) relataram que a injúria da radiação é classificada como aguda, conseqüencial e tardia. A primeira é observada durante o tratamento ou após poucas semanas. A segunda aparece subseqüentemente, sendo causada pelo dano agudo persistente. Já o efeito tardio é evidenciado meses a anos após a conclusão da radioterapia.

Apesar de não haver diferença estatística, entre os grupos estudados, quanto ao grau de hialinização da matriz, os resultados desta pesquisa demonstraram que em todos os espécimes, o tecido pulpar coronário dos molares dos ratos, independentemente do grupo, apresentou algum grau de hialinização da matriz, sendo focal em alguns espécimes, e extensa, em outros.

Neste experimento, teve-se a pretensão de estudar a ocorrência de fibrose pulpar em molares de ratos irradiados, tanto de forma qualitativa, avaliando o grau de hialinização da matriz, quanto de forma quantitativa, determinando o percentual médio ocupado pelo colágeno, nas lâminas coradas com HE e com Picrossírius, respectivamente. Os resultados demonstraram que a teleterapia fracionada em cabeça, nos diferentes períodos experimentais desta pesquisa, não afetou o grau de hialinização da matriz, nem o percentual médio de colágeno em polpas coronárias de ratos.

No entanto, avaliando as Tabelas 4 e 5, percebe-se que apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com relação ao percentual médio de colágeno pulpar, o valor de p ficou muito próximo de 0,05. No grupo 2, ou seja, nos animais irradiados e eutanasiados após 30 dias da conclusão da radioterapia, a média de colágeno foi superior a dos demais grupos. O emprego de um número amostral maior poderia acarretar em significância estatística, com um aumento do percentual médio de colágeno pulpar em molares de ratos irradiados, em períodos subseqüentes à radioterapia.

Em alguns espécimes irradiados deste estudo, pôde-se observar a formação de osteodentina, caracterizada pelo aprisionamento de odontoblastos na matriz orgânica deste tecido. Apesar deste material dentinóide ou osteóide irregular ter sido amplamente citado na literatura em dentes em formação expostos à radioterapia (LEIST, 1927; SMITH, 1938; BURSTONE, 1950; MEDAK et al., 1952; HANSEN; ENGLISH, 1957; GOWGIEL, 1961; ADKINS, 1967; SWEENEY; ELZAY; LEVITT, 1977), poucos são os estudos que descrevem sua presença em dentes completamente formados, como é o caso do trabalho de Kalnins (1954) e do presente experimento. Como este foi um achado eventual, não foi possível

estabelecer uma relação positiva entre irradiação e formação de osteodentina. O mecanismo pelo qual a radioterapia favoreceria esse fenômeno não está descrito. Uma especulação seria que a irradiação pudesse estimular um movimento desordenado dos odontoblastos ou provocar uma diminuição dos complexos juncionais na camada odontoblástica. No entanto, os dados deste estudo não permitem chegar a uma conclusão definitiva deste processo.

Aventa-se que o efeito da irradiação ao tecido pulpar de pacientes submetidos à radioterapia, na região de cabeça e pescoço, possa ser mais notável do que o evidenciado em modelos animais. A maioria dos pacientes acometidos por câncer na região de cabeça e pescoço apresenta-se entre a quinta e a sexta década de vida (PYLE; SAWYER, 1997). Assim, além das alterações pulpares decorrentes da idade e dos agentes externos como cárie, traumatismo, atrição, abrasão, erosão, preparos cavitários e protéticos, restaurações que diminuem o potencial de reparo do órgão pulpar às injúrias, a maioria desses pacientes apresenta restaurações metálicas nos dentes, que resultariam na emissão de elétrons secundários (THILMANN et al., 1996). Estes autores observaram que o aumento da dose de irradiação, proporcionado pela presença de restaurações metálicas de ouro, paládio e amálgama, implica a presença de mucosite nas proximidades desses materiais.

No trabalho de Nickens et al. (1977), os dentes dos macacos foram restaurados com diferentes materiais como o amálgama, a resina composta e o ouro, sendo que exclusivamente um macaco foi submetido à radioterapia fracionada, servindo o outro como controle. Os resultados, no entanto, sugeriram que a radiação ionizante aplicada na região dos maxilares não impede a capacidade reacional do tecido pulpar, uma vez que dentina reparadora foi evidenciada nas adjacências do material restaurador. Cabe considerar, no entanto, que as polpas analisadas não

havia experimentado progressos episódios de cárie, sendo realizados, especificamente, o preparo cavitário e a restauração. Essa não é realidade clínica percebida em pacientes oncológicos submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço. Brown; Miller; Bottomley (1990) relataram que, de 92 pacientes oncológicos que necessitavam de irradiação terapêutica na região de cabeça e pescoço, submetidos a um exame dental prévio ao início da terapia, 73 necessitaram de algum tipo de tratamento dentário antes do início do tratamento, como exodontia, restaurações e/ou endodontia.

O tecido pulpar, principalmente o jovem, possui uma grande capacidade de se proteger contra o ataque bacteriano direto ou indireto oriundo de uma cavidade de cárie. A esclerose dentinária, a produção de dentina reparadora e a inflamação pulpar são exemplos de defesas despendidas pelo órgão pulpar. Paiva; Antoniazzi (1988), Siqueira Jr; Lopes (1999), Soares; Goldberg (2001) relataram que o tecido pulpar comporta-se, basicamente, de forma semelhante a outros conjuntivos quando é atingido pela injúria, ou seja, através da instalação de reação inflamatória, cuja severidade é proporcional à intensidade do agressor. Por outro lado, com o passar do tempo, várias são as injúrias as quais o tecido pulpar é submetido. Assim, a cada agressão e pronto reparo, percebe-se que no local injuriado, há uma diminuição do número de células e do volume pulpar, associada a uma fibrose local (CONSOLARO, 1998). Por isso, a capacidade reacional da polpa vai diminuindo com o avançar da idade e com o somatório de exposição a agentes nocivos. Considerando o exposto, poder-se-ia pensar que a resposta do tecido pulpar à irradiação seria diferente em tecidos anteriormente expostos a processos cariosos, como é o caso da maioria dos pacientes portadores de câncer na região de cabeça e pescoço, que utilizam a radioterapia como modalidade de tratamento, em função

desse tecido possuir uma menor capacidade reacional, por encontrar-se menos celular com a idade.

Por outro lado, se a polpa de um paciente adulto tivesse mais chances, em relação ao paciente jovem, de sucumbir ou necrosar, em função de um possível dano da radiação ao tecido, poder-se-ia, também, suscitar o fato de que o tecido pulpar, uma vez terminado o processo formativo do dente, tornar-se-ia menos ativo, adquirindo um aumento na resistência à radiação, conforme descrito por Hutton et al. (1974), ao tentar justificar a inexistência de alterações em polpas irradiadas de macacos.

O estudo do efeito da radioterapia fracionada na polpa dental pareceu-nos adequado, uma vez que, engajados na prática clínica diária de pacientes oncológicos e alicerçados em algumas evidências científicas, sugere-se que a dor pulpar em pacientes com cárie de radiação seja menos extensa, mesmo em casos onde a mesma encontra-se exposta, conforme relato de Del Regato (1939), citado por Masella; Cupps; Laney (1972). Para Shafer; Hine; Levy (1974), esta perda de sintomas é devida, muito provavelmente, à redução na resposta aguda vascular como resultado da injúria provocada pela irradiação, seguida pela fibrose e atrofia celular. Kielbassa et al. (1995) relataram que o suprimento vascular da polpa é comprometido em pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço, para tratamento de câncer. Assim, os mecanismos de reparo e nutrição, após uma infecção, ficam diminuídos. Estas alterações indiretas, após a radioterapia, poderiam ser as responsáveis pela redução da capacidade defensiva da polpa, observada após cáries rampantes e infecções. Dessa forma, uma inflamação acentuada finalmente poderia predispor a um risco aumentado de osteorradionecrose séptica.

Avaliando a aplicabilidade clínica deste estudo, enfatiza-se que o tecido pulpar, uma vez exposto às distintas agressões sofridas com o decorrer do tempo, associadas à injúria decorrente da irradiação, poderia facilmente ser acometido por necrose pulpar. Nestes casos, o forame apical seria a porta de entrada para a infecção óssea periapical, podendo ocasionar o estabelecimento de osteorradiocrose. Assim, o diagnóstico precoce dessa condição e a intervenção do cirurgião-dentista em tempo hábil, por intermédio do tratamento endodôntico, quando necessário, poderia interromper esse processo de infecção óssea, proporcionando uma melhor qualidade de vida ao paciente irradiado.

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada neste estudo e nos resultados obtidos, pode-se concluir que a teleterapia fracionada por Co^{60} é:

- incapaz de provocar processo inflamatório, hialinização da matriz ou mudança significativa no percentual médio de colágeno, em polpa coronária de molares de ratos irradiados e eutanasiados imediatamente e 30 dias após a radioterapia;
- capaz de causar alteração nuclear estatisticamente significativa, em relação aos grupos-controle, em fibroblastos e odontoblastos pulpare de molares de ratos irradiados, evidenciada em MO, sendo mais expressiva imediatamente após a conclusão do tratamento radioterápico do que aos 30 dias subseqüentes;
- capaz de causar alteração nuclear e citoplasmática, evidenciada em MET, nos fibroblastos do terço médio pulpar de incisivos inferiores de animais irradiados e eutanasiados imediatamente após a conclusão do tratamento radioterápico.

REFERÊNCIAS

ADKINS, K.F. The effect of 1200 r of X-radiation on dentinogenesis in the mandibular teeth of rats. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 12, n.12, p. 1569-1576, July/Dec. 1967.

ANNEROTH, G.; HOLM, L.E.; KARLSSON, G. The effect of radiation on teeth. A clinical, histologic and microradiographic study. **Int J Oral Surg**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 269-274, June 1985.

ARWILL, T. et al. Ultrastructure of nerves in the dentinal-pulp border zone after sensory and autonomic nerve transection in the cat. **Acta Odont Scand**, Stockholm, v. 31, n.5, p. 273-281, Sept. 1973.

BAKER, D.G. The radiobiological basis for tissue reactions in the oral cavity following therapeutic X-irradiation. A review. **Arch Otolaryngol**, Chicago, v. 108, n. 1, p. 21-24, Jan. 1982.

BARROS, S.; BOZZO, L.; GREGÓRIO, E.A. Alterações ultra-estruturais das fibras nervosas pulpares relacionadas com processo de cárie. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 251-255, out./dez. 1994.

BEUMER III, J.; BRADY, F.A. Dental management of the irradiated patient. **Int J Oral Surg**, Copenhagen, v. 7, n. 3, p. 208-220, June 1978.

BLOZIS, G.G.; ROBINSON, J.E. Oral tissue changes caused by radiation therapy and their management. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v. 12, n. 3, p. 643-656, Nov. 1968.

BROWN, R.S.; MILLER, J.H.; BOTTOMLEY, W.K. A retrospective oral/dental evaluation of 92 head and neck oncology patients, before, during and after irradiation therapy. **Gerodontology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 35-39, Summer 1990.

BRUCE, K.W.; STAFNE, E.C. The effect of irradiation on the dental system as demonstrated by the roentgenogram. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 41, n. 6, p. 684-689, Dec. 1950.

BURKE, F.J.T.; FRAME, J.W. The effect of irradiation on developing teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 47, n. 1, p. 11-13, Jan. 1979.

BURSTONE, M.S. The effect of X-ray irradiation on the teeth and supporting structures of the mouse. **J Dent Res**, Alexandria, v. 29, n. 2, p. 220-231, Apr 1950.

CAIELLI, C.; MARTHA, P.M.; DIB, L.L. Seqüelas orais da radioterapia: atuação da Odontologia na prevenção e tratamento. **Rev Bras Cancerol**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 231-241, out./dez. 1995.

CARL, U.M. et al. Radiotherapy of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat: postoperative radiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, Elmsford, v. 18, n. 4, p. 883-886, Apr. 1990.

CARVALHO, R.A.; FIGUEIREDO, J.A.P. Histofisiologia do complexo dentino-pulpar. In: LOPES, H.P.; SIQUEIRA JR, J.F. **Endodontia**. Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. p. 1-12.

CEELEN, W. et al. Influence of preoperative high-dose radiotherapy on postoperative outcome and colonic anastomotic healing. **Dis Colon Rectum**, Philadelphia, v. 44, n. 5, p. 717-721, May 2001.

CHENG, C.F. et al. Effects of cancer therapy on dental and maxillofacial development in children: Report of Case. **J Dent Child**, Chicago, v. 67, n. 3, p. 218-222, May/June 2000.

CONSOLARO, A. Alterações pulpare: Correlações clínico-radiográficas e microscópicas. In: LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. **Endodontia**. Tratamento de Canais Radiculares. 3. ed. São Paulo: Panamericana, 1998. p. 41-61.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia celular I: Lesão e morte da célula. In: _____ . **Robbins. Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1-26.

COUVE, E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 643-651, Oct. 1986.

COX, F.L. Endodontics and the irradiated patient. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 42, n. 5, p. 679-684, Nov. 1976.

DALE, P.P. The effect of chronic X-ray irradiation on the rat dentition. **J Dent Res**, Alexandria, v. 27, n. 6, p. 730, Dec. 1948.

_____. The effect of X-ray irradiation on the rat incisor. **J Dent Res**, Alexandria, v. 32, n. 1, p. 117-125, Feb. 1953.

DAHLLÖF, G. et al. Histologic changes in dental morphology induced by high dose chemotherapy and total body irradiation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 77, n. 1, p. 56-60, Jan. 1994.

DE MOOR, R. Influence directe et indirecte de la médication (chimiothérapie y comprise) et de l'irradiation sur la pulpe. **Rev Belge Med Dent**, Bruxelles, v. 55, n. 4, p. 321-333, Oct. 2000.

DEGERING, C.I. Etiological factors in osteoradionecrosis. **J Conn State Dent Assoc**, Hartford, v. 45, n. 1, p. 13-23, Jan. 1971.

DIAS, M.C.G.; MACULEVICIUS, J. Terapia nutricional domiciliar no doente com câncer de cabeça e pescoço. **Nutrição em Pauta**, v. 12, n. 67, jul./ago. 2004. Disponível em: <<http://www.nutricaoempauta.com.br/novo/38/entparent.html>>. Acesso em: 24/08/2004.

DURY, D.C. et al. Dental root agenesis secondary to irradiation therapy in a case of rhabdomyosarcoma of the middle ear. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 57, n. 6, p. 595-599, June 1984.

ENGLISH, J.A. Localization of radiation effects in rats' teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v. 9, n. 10, p. 1132-1138, Oct. 1956.

ENGLISH, J.A.; SCHLACK C.A.; ELLINGER, F. Oral manifestations of ionizing radiation II. Effect of 200 kV. X-ray on rat incisor teeth when administered locally to the head in the 1500 r. dose range. **J Dent Res**, Alexandria, v. 33, n. 3, p. 377-388, June 1954.

ENGLISH, J.A.; TULLIS, J.L. Oral manifestations of ionizing radiation I. Oral lesions and effect on developing teeth of swine exposed to 2000 kV total body X-ray irradiation. **J Dent Res**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 33-52, Feb. 1951.

FAWZI, M.I.; SHKLAR, G.; KRAKOW, A.A. The effect of radiation on the response of dental pulp to operative and endodontic procedures: An experimental study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 59, n. 4, p. 405-413, Apr. 1985.

FEHÉR, E.; CSÁNYI, K.; VAJDA, J. Ultrastructure and degeneration analysis of the nerve fibres of the tooth pulp in the cat. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 22, n.12, p. 699-704, Dec. 1977.

FONKALSRUD, E.W. et al. Serial changes in arterial structure following radiation therapy. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 145, n. 3, p. 395-400, Sept. 1977.

FRANK, R.M.; HERDLY, J.; PHILIPPE, E. Acquired dental defects and salivary gland lesions after irradiation for carcinoma. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 70, n. 4, p. 868-883, Apr. 1965.

GAJDUSEK, C. et al. Early molecular changes in irradiated aortic endothelium. **J Cell Physiol**, Philadelphia, v.188, n.1, p. 8-23, July 2001.

GEIST, J.R.; KAFRAWY, A.H.; SHUPE, R.E. The effect of MPG on radiation-induced odontogenic tissue metaplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 65, n. 1, p. 109-113, Jan. 1988.

GOWGIEL, J.M. Experimental radio-osteonecrosis of the jaws. **J Dent Res**, Alexandria, v. 39, n. 1, p. 176-197, Feb. 1960.

_____. Eruption of irradiation-produced rootless teeth in monkeys. **J Dent Res**, Alexandria, v. 40, n. 3, p. 538-547, May/June 1961.

GREULICH, R.C.; ERSHOFF, B.H. Delayed effects of multiple sublethal doses of total body X-irradiation on the periodontium and teeth of mice. **J Dent Res**, Alexandria, v. 40, n. 6, p. 1211-1224, Nov./Dec. 1961.

GRIFFIN, C.J.; HARRIS, R. Ultrastructure of collagen fibrils and fibroblasts of the developing human dental pulp. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 659-666, July 1966.

GVOZDENOVIC-SEDLICKI, S.; QVIST, V.; HANSEN, H.P. Histologic variations in the pulp of intact premolars from young individuals. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 81, n. 6, p. 443-440, Nov./Dec. 1973.

HALL, E.J. The physics and chemistry of radiation absorption. In: _____. **Radiobiology for the radiologist**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 5-16.

HANSEN, L.S.; ENGLISH, J.A. Histologic changes in the incisor teeth of rats serially sacrificed after receiving 1500 r of 200 kV X-ray irradiation. **J Dent Res**, Alexandria, v. 36, n. 3, p. 417-431, June 1957.

HELLMAN, S. Principles of cancer management: radiation therapy. In: DE VITA JR, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. (eds) **Cancer**. Principles & practice of oncology. 5th.ed. New York: Lippincott-Raven, 1997. p. 307-332.

HIGASHI, T.; OKAMOTO, H. Characteristics and effects of calcified degenerative zones on the formation of hard tissue barriers in amputated canine dental pulp. **J Endod**, Chicago, v. 22, n. 4, p. 168-172, Apr. 1996a.

_____. Electron microscopic study on interodontoblastic collagen fibrils in amputated canine dental pulp. **J Endod**, Chicago, v. 22, n. 3, p.116-119, Mar. 1996b.

HÖLTTÄ, P. et al. Long-term adverse effects on dentition in children with poor-risk neuroblastoma treated with high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation with or without total body irradiation. **Bone Marrow Transplant**, Basingstonke, v. 29, n. 2, p.121-127, Jan. 2002.

HUTTON, M.F. et al. The effect of cobalt-60 radiation on the dental pulps of monkeys. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 38, n. 2, p. 279-286, Aug. 1974.

JEKEL, J.F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D.L. Delineamentos comuns de pesquisa usados em Epidemiologia. In: _____. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. p. 79-87.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, London, v. 11, n. 4, p. 447-455, July 1979.

KALNINS, V. The indirect effect of X-ray irradiation on the dental pulp of the dog. **J Dent Res**, Alexandria, v. 33, n. 3, p. 389-399, June 1954.

KARADZOV, O.M. et al. The effects of X-ray irradiation of the head region of eight-day-old rats on the development of molar and incisor teeth. **Strahlentherapie**, München, v. 161, n. 7, p. 448-452, July 1985.

KASTE, S.C. et al. Dental abnormalities in children treated for acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, Baltimore, v. 11, n. 6, p. 792-796, June 1997.

KIELBASSA, A.M. et al. Endodontic therapy in a postirradiated child: Review of the literature and report of a case. **Quintessence Int**, Berlin, v. 26, n. 6, p. 405-411, June 1995.

KIMELDORF, D.J.; JONES, D.C.; CASTANERA, T.J. Reviews of general subjects. The radiobiology of teeth. **Radiat Res**, New York, v. 20, p. 518-540, Oct. 1963.

KLEINEIDAM, M.; PIECONKA, A.; BECK-BORNHOLDT, H.P. Radiotherapy of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat: influence of the time interval between two daily fractions during hyperfractionated radiotherapy. **Radiother Oncol**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 128-132, Feb. 1994.

KRELL, K.V.; McMURTREY, L.G.; WALTON, R.E. Vasculature of the dental pulp of atherosclerotic monkeys: light and electron microscopic findings. **J Endod**, Chicago, v.20, n. 10, p. 469-473, Oct. 1994.

LANGLAND, O.E.; LANGLAIS, R.P. Biologia das radiações. In: _____. **Princípios do diagnóstico por imagem em Odontologia**. São Paulo: Santos, 2002. p. 291-309.

LEIST, M. Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen und des Radiums auf Zähne und Kiefer, **Strahlentherapie**, München, v. 24, p. 268-281, 1927.

LIMA, A.A.S. et al. Radioterapia de neoplasias malignas na região da cabeça e pescoço – o que o cirurgião-dentista precisa saber. **Rev Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 16, n. 33, p. 156-165, maio/ago. 2001.

LYROUDIA, K. et al. Computerized reconstruction of TEM examined pulpal blood vessels and nerves. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 11, n. 4, p. 189-195, Aug. 1994.

MARX, R.E.; JOHNSON, R.P. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v. 64, n. 4, p. 379-390, Oct. 1987.

MASELLA, R.P.; CUPPS, R.E.; LANEY, W.R. Dental management of the irradiated patient. **Northwest Dent**, St. Paul, v. 51, n. 5, p. 269-275, Sept./Oct. 1972.

MATHES, S.J.; ALEXANDER, J. Radiation injury. **Surg Oncol Clin N Am**, Philadelphia, v. 5, n. 4, p. 809-824, Oct. 1996.

MATSON, J.E. et al. Effect of cobalt-60 radiation on response to endodontic therapy in monkeys. **Cancer**, New York, v. 42, n. 6, p. 2581-2590, Dec. 1978.

MEDAK, H.; SCHOUR, I; KLAUBER JR, W.A. The effect of single doses of irradiation upon the eruption of the upper rat incisor. **J Dent Res**, Alexandria, v. 29, n. 6, p. 839-842, Dec. 1950.

MEDAK, H. et al. The effect of single doses of irradiation upon the tissues of the upper rat incisor. **J Dent Res**, Alexandria, v. 31, n. 4, p. 559-574, Aug. 1952.

METTLER JR, F.A.; UPTON, A.C. Basic radiation physics, chemistry, and biology. In: _____. **Medical effects of ionizing radiation**. 2nd.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p. 1- 29.

MEYER, I.; SHKLAR, G.; TURNER, J. A comparison of the effects of 200 kV radiation and cobalt-60 radiation on the jaws and dental structure of the white rat. A preliminary report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 15, n. 9, p. 1098-1108, Sept. 1962.

_____. Tissue healing and infection in experimental animals irradiated with cobalt-60 and orthovoltage. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 21, n. 3, p. 333-340, Mar. 1966.

MURRAY, P.E. et al. Analysis of incisor pulp cell populations in Wistar rats of different ages. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 47, n. 10, p. 709-715, Oct. 2002.

NÄSMAN, M. et al. Disturbances in the oral cavity in pediatric long-term survivors after different forms of antineoplastic therapy. **Pediatr Dent**, Chicago, v. 16, n. 3, p. 217-223, May/June 1994.

NÄSMAN, M.; FORSBERG, C.-M.; DAHLLÖF, G. Long-term dental development in children after treatment for malignant disease. **Eur J Orthod**, London, v. 19, n. 2, p. 151-159, Apr. 1997.

NATHANSON, A.; BÄCKSTRÖM, A. Effects of ^{60}Co - γ -irradiation on teeth and jaw bone in the rabbit. **Scand J Plast Reconstr Surg**, Stockholm, v.12, n.1, p. 1-17, Jan. 1978.

NICKENS, G.E. et al. Effect of cobalt-60 radiation on the pulp of restored teeth. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 94, n. 4, p. 701-704, Apr. 1977.

OKAMURA, K. et al. Ultrastructure of the neuromuscular junction of vasomotor nerves in the microvasculature of human dental pulp. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 171-176, Mar. 1994.

PAIVA, J.G.; ANTONIAZZI, J.H. Etiopatogenia das alterações pulpares. In: _____. **Endodontia**. Bases para a prática clínica. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1988. p. 37-76.

PAJARI, U.; LANNING, M. Developmental defects of teeth in survivors of childhood all are related to the therapy and age at diagnosis. **Med Pediatr Oncol**, New York, v. 24, n. 5, p. 310-314, May 1995.

PARSONS, J.T. et al. An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, Tarrytown, v. 39, n. 1, p. 137-148, Aug. 1997.

POYTON, H.G. The effects of radiation on teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v. 26, n. 5, p. 639-646, Nov. 1968.

PYLE, M.A.; SAWYER, D.R. Comparison of hospitals' dental consultation rates for head and neck cancer patients. **Spec Care Dentist**, Chicago, v. 17, n. 5, p. 175-179, Sept./Oct. 1997.

READER, A.; FOREMAN, D.W. An ultrastructural quantitative investigation of human intradental innervation. **J Endod**, Chicago, v. 7, n. 11, p. 493-499, Nov. 1981.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J. Condições ulcerativas. In: _____. **Patologia bucal**. Correlações Clinicopatológicas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 27-75.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol**, New York, v. 17, p. 208-212, Apr. 1963.

ROHRER, M.D. et al. The effect of cobalt-60 irradiation on monkeys mandibles. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v. 48, n. 5, p. 424-440, Nov. 1979.

SAGOWSKI, C. et al. Reduction late toxicity with amifostine in fractionated irradiation of the rat salivary glands. **HNO**, Berlin, v.50, n.9, p. 822-828, Sept. 2002.

SAGOWSKI, C. et al. The radioprotectors amifostine and sodium selenite do not modify the radiosensitivity of rat rhabdomyosarcomas. **Onkologie**, Basel, v. 27, n. 1, p. 54-57, Feb. 2004.

SALOMON, J.P.; SEPTIER, D.; GOLDBERG, M. Ultrastructure of inter-odontoblastic fibres in the rat molar. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 171-176, 1991.

SÁNCHEZ-OSORIO, B. Ultraestructura del organo pulpar dentario humano. **Acta Odontol Venez**, Caracas, v. 16, n. 3, p. 291-308, Sep./ Dic. 1978.

SÁNCHEZ-OSORIO, B. et al. Contribución al estudio ultraestructural del odontoblasto. **Acta Odontol Venez**, Caracas, v.26, n.3, p. 4-12, Sep./Dic. 1988.

SATO, O. et al. Immunoelectron microscopic observation of Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)-positive nerves in the dental pulp of rat molars. **Arch Histol Cytol**, Niigata, v. 55, n. 5, p. 561-568, Dec. 1992.

SEGRETO, H.R.C.; SEGRETO, R.A. Revisão e atualização em radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos. **Folha Med**, Rio de Janeiro, v. 119, n. 4, p. 9-27, out./dez. 2000.

SELAK, I.; SEREMET, M.; MILOSEVIC, Z. Morphologic changes in the pulp and surrounding structures of the teeth in irradiated animals. **Med Arh**, Sarajevo, v. 47, n. 3-4, p. 73-75, July 1993.

SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. Physical and chemical injuries of the oral cavity. In: _____. **A textbook of oral pathology**. 3rd. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1974. p. 481-581.

SILVA, J.L.F.; ARRUDA, F.F. Radioterapia nos tumores de cabeça e pescoço – Aspectos gerais. In: GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de Oncologia**. São Paulo: BBS, 2004. p. 475-488.

SILVERMAN JR, S.; CHIERICI, G. Radiation therapy of oral carcinoma – I. Effects on oral tissues and management of the periodontium. **J Periodontol**, Chicago, v. 36, n. 6, p. 478-484, Nov./Dec. 1965.

SILVERMAN, S.; SHELINE, G.E. Effects of radiation on exfoliated normal and malignant oral cells. A preliminary study. **Cancer**, New York, v.14, n.3, p. 587-596, May/June 1961.

SIQUEIRA JR, J.F.; LOPES, H.P. Patologia da polpa e dos tecidos perirradiculares. In: LOPES, H.P.; SIQUEIRA JR, J.F. **Endodontia**. Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. p. 13-59.

SMITH, R.A. The effect of roentgen rays on the developing teeth of rats. **J Am Dent Ass**, Chicago, v. 18, n. 1, p. 111-118, Jan. 1931.

_____. Effect of X-rays on the developing teeth of rats. **Am J Orthod Oral Surg**, St. Louis, v. 24, p. 428-434, 1938.

SOARES, I.J.; GOLDBERG, F. O cenário. In: _____. **Endodontia**. Técnicas e Fundamentos. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 23-26.

SOUZA, M.A.L. Biologia pulpar. In: ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J.A.P. **Endodontia**. Princípios Biológicos e Mecânicos. Artes Médicas: São Paulo, 1999. p. 1-24.

STAFNE, E.C.; BOWING, H.H. The teeth and their supporting structures in patients treated by irradiation. **Am J Orthod Oral Surg**, St. Louis, v. 33, n. 8, p. 567-581, Aug. 1947.

STONE, H.B. et al. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. **Oncology**, Basel, v. 4, n. 9, p. 529-536, Sept. 2003.

SWEENEY, W.T.; ELZAY, R.P.; LEVITT, S.H. Histologic effect of fractionated doses of selectively applied ⁶⁰Co irradiation on the teeth of albino rats. **J Dent Res**, Alexandria, v. 56, n. 11, p. 1403-1407, Nov. 1977.

TAKEDA, Y. et al. Failure of root development of human permanent teeth following irradiation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 16, n. 3, p. 376-382, June 1987.

TAKINAMI, S. et al. Radiation-induced hypoplasia of the teeth and mandible. A case report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 78, n. 3, p. 382-384, Sept. 1994.

TAYLOR, G.N. et al. Influence of ^{226}Ra and ^{239}Pu on the dental root canal of the dog. **J Dent Res**, Alexandria, v. 48, n. 5, p. 924-927, Sept./Oct. 1969.

TEN CATE, A.R. Citoesqueleto, junções e fibroblastos. In: _____ . **Histologia bucal**. Desenvolvimento, Estrutura e Função. 5. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. p. 50-67.

THILMANN, C. et al. In vivo dose increase in the presence of dental alloys during ^{60}Co -gamma-ray therapy of the oral cavity. **Med Dosim**, New York, v. 21, n. 3, p. 149-154, 1996.

TORNECK, C.D. Complexo dentina-polpa. In: TEN CATE, A.R. **Histologia bucal**. Desenvolvimento, Estrutura e Função. 5. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. p. 143-185.

WANG, C.C. **Radioterapia**: Princípios, indicações e resultados. Porto Alegre: Centro de Oncologia Radioterápica do Rio Grande do Sul, 1978. 33p.

WEINSTOCK, M.; LEBLOND, C.P. Formation of collagen. **Fed Proc**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1205-1218, May 1974.

WEYMAN, J. The effect of irradiation on developing teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 25, n. 4, p. 623-629, Apr. 1968.

WÜRSCHMIDT, F. et al. Radiotherapy of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat: recovery from radiation injury in tumour and skin. **Radiother Oncol**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 105-110, Feb. 1992.

YOSHIDA, S.; OHSHIMA, H. Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts. **Anat Rec**, New York, v. 245, n. 2, p. 313-326, June 1996.

ZYWIETZ, F.; HAHN, L.S.; LIERSE, W. Ultrastructural studies on tumor capillaries of a rat rhabdomyosarcoma during fractionated radiotherapy. **Acta Anat**, Basel, v. 150, n. 1, p. 80-85, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Peso (g) inicial dos animais dos grupos experimentais e controles.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
265	279	246	266
288	290	235	256
266	245	280	258
264	230	277	267
220	255	258	289
298	228	260	243
276	226	265	259
334	258		260
280	246		
288	280		
262	270		
244	259		
228	266		
287	247		
270	264		
Média = 271,3	Média = 256,2	Média = 260,1	Média = 262,3

APÊNDICE B - Peso (g) final dos animais dos grupos experimentais e controles.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
220	301	264	267
238	236	256	295
212	302	294	293
215	235	262	278
235	252	308	304
216	279	277	329
228	221	285	304
241	254		295
269	225		
235	230		
238	262		
217	247		
256	219		
219	256		
220			
Média = 230,6	Média = 251,4	Média = 278,0	Média = 295,6

APÊNDICE C - Seqüência da pré-embrição dos espécimes pulpares, em resina epóxi EPON 812 e acetona pura.

- uma parte de EPON 812 + 3 partes de acetona por 2 horas
- uma parte de EPON 812 + 2 partes de acetona por 2 horas
- uma parte de EPON 812 + 1 parte de acetona por 24 horas
- duas partes de EPON 812 + 1 parte de acetona por 2 horas
- três partes de EPON 812 + 1 parte de acetona por 2 horas.

APÊNDICE D - Classificação das lâminas histológicas coradas com HE, quanto à presença e ausência de processo inflamatório em polpa coronária de molares de ratos, nos grupos experimentais e controles.

LAMINA	GRUPO-AMOSTRA	MOLAR	PROCESSO INFLAMATÓRIO		
			1ª avaliação	2ª avaliação	aval. final
1	g2-11	1º	ausente	ausente	ausente
2	g1-8	1º	ausente	ausente	ausente
3	g1-1	1º	ausente	ausente	ausente
4	g3-12	1º	ausente	ausente	ausente
5	g1-6	1º	ausente	ausente	ausente
7	g3-7	1º	ausente	ausente	ausente
8	g1-2	1º	ausente	ausente	ausente
9	g3-8	1º	ausente	ausente	ausente
10	g1-14	1º	ausente	ausente	ausente
11	g2-4	1º	ausente	ausente	ausente
13	g1-12	2º	ausente	ausente	ausente
14	g1-3	2º	ausente	ausente	ausente
15	g4-9	1º	ausente	ausente	ausente
16	g2-3	1º	ausente	ausente	ausente
17	g3-15	2º	ausente	ausente	ausente
18	g1-11	2º	ausente	ausente	ausente
19	g2-2	1º	ausente	ausente	ausente
20	g3-5	1º	ausente	ausente	ausente
21	g1-4	2º	ausente	ausente	ausente
22	g2-6	1º	ausente	ausente	ausente
23	g4-4	2º	ausente	ausente	ausente
25	g4-14	1º	ausente	ausente	ausente
26	g2-9	2º	ausente	ausente	ausente
27	g1-7	1º	ausente	ausente	ausente
28	g1-9	1º	ausente	ausente	ausente
29	g2-12	1º	ausente	ausente	ausente
30	g1-15	3º	ausente	ausente	ausente
31	g4-10	1º	ausente	ausente	ausente
32	g1-10	1º	ausente	ausente	ausente
34	g4-11	1º	ausente	ausente	ausente

36	g1-13	3º	ausente	ausente	ausente
37	g2-10	1º	ausente	ausente	ausente
38	g3-1	1º	ausente	ausente	ausente
40	g2-7	1º	ausente	ausente	ausente
41	g3-13	2º	ausente	ausente	ausente
42	g2-13	1º	ausente	ausente	ausente

APÊNDICE E - Grau de concordância intra-observador entre a primeira e a segunda avaliação, quanto à presença e extensão de alteração nuclear em polpas coronárias de molares de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.

2ª avaliação	1ª avaliação			Total
	Escore 1	Escore 2	Escore 3	
Escore 1	17	1	-	18
Escore 2	4	4	-	8
Escore 3	-	-	10	10
Total	21	5	10	36

Escores: 1 – Ausente; 2 – Presente em moderada quantidade de células; 3 – Presente na maioria das células

Kappa= 0,769 ; Percentual de concordância= 86,1%

Fonte: Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS

APÊNDICE F - Classificação das lâminas histológicas coradas com HE, quanto à presença e extensão de alteração nuclear em polpa coronária de molares de ratos, nos grupos experimentais e controles.

LAMINA	GRUPO-AMOSTRA	MOLAR	ALTERAÇÃO NUCLEAR		
			1ª avaliação	2ª avaliação	aval. final
1	g2-11	1º	1	2	2
2	g1-8	1º	3	3	3
3	g1-1	1º	1	1	1
4	g3-12	1º	1	1	1
5	g1-6	1º	3	3	3
7	g3-7	1º	1	1	1
8	g1-2	1º	1	2	1
9	g3-8	1º	1	1	1
10	g1-14	1º	1	1	1
11	g2-4	1º	3	3	3
13	g1-12	2º	3	3	3
14	g1-3	2º	1	1	1
15	g4-9	1º	1	1	1
16	g2-3	1º	2	1	2
17	g3-15	2º	1	1	1
18	g1-11	2º	3	3	3
19	g2-2	1º	3	3	3

20	g3-5	1°	1	1	1
21	g1-4	2°	3	3	3
22	g2-6	1°	2	2	2
23	g4-4	2°	1	1	1
25	g4-14	1°	1	1	1
26	g2-9	2°	1	2	2
27	g1-7	1°	3	3	3
28	g1-9	1°	3	3	3
29	g2-12	1°	2	2	2
30	g1-15	3°	1	1	1
31	g4-10	1°	1	1	1
32	g1-10	1°	1	1	1
34	g4-11	1°	1	1	1
36	g1-13	3°	2	2	2
37	g2-10	1°	3	3	3
38	g3-1	1°	1	1	1
40	g2-7	1°	1	2	2
41	g3-13	2°	1	1	1
42	g2-13	1°	2	2	2

Escore 1 – Ausente

Escore 2 – Presente em moderada quantidade de células

Escore 3 – Presente na maioria das células

APÊNDICE G - Classificação das lâminas histológicas coradas com HE, quanto à presença e extensão de hialinização da matriz em polpa coronária de molares de ratos, nos grupos experimentais e controles.

LAMINA	GRUPO-AMOSTRA	MOLAR	HIALINIZAÇÃO DA MATRIZ		
			1ª avaliação	2ª avaliação	aval. final
1	g2-11	1°	2	2	2
2	g1-8	1°	2	2	2
3	g1-1	1°	3	3	3
4	g3-12	1°	1	2	2
5	g1-6	1°	3	3	3
7	g3-7	1°	2	2	2
8	g1-2	1°	3	3	3
9	g3-8	1°	3	3	3
10	g1-14	1°	3	3	3
11	g2-4	1°	3	3	3
13	g1-12	2°	2	2	2
14	g1-3	2°	2	3	3
15	g4-9	1°	2	2	2
16	g2-3	1°	3	3	3
17	g3-15	2°	3	3	3
18	g1-11	2°	2	2	2
19	g2-2	1°	3	3	3
20	g3-5	1°	2	2	2
21	g1-4	2°	3	3	3
22	g2-6	1°	2	2	2
23	g4-4	2°	2	1	2
25	g4-14	1°	3	3	3
26	g2-9	2°	2	2	2
27	g1-7	1°	2	2	2

28	g1-9	1º	2	2	2
29	g2-12	1º	2	2	2
30	g1-15	3º	2	2	2
31	g4-10	1º	1	2	2
32	g1-10	1º	2	2	2
34	g4-11	1º	2	2	2
36	g1-13	3º	2	2	2
37	g2-10	1º	3	3	3
38	g3-1	1º	1	2	2
40	g2-7	1º	3	3	3
41	g3-13	2º	2	2	2
42	g2-13	1º	3	3	3

Escore 1 – Ausente

Escore 2 – Focal

Escore 3 – Extensa

APÊNDICE H - Grau de concordância intra-observador entre a primeira e a segunda avaliação, quanto à presença e extensão de hialinização da matriz em polpas coronárias de molares de ratos coradas com HE, nos grupos experimentais e controles. Porto Alegre, 2005.

2ª avaliação	1ª avaliação			Total
	Escore 1	Escore 2	Escore 3	
Escore 1	-	1	-	1
Escore 2	3	17	-	20
Escore 3	-	1	14	15
Total	3	19	14	36

Escores: 1 – Ausente; 2 – Focal; 3 – Extensa

Kappa = 0,744; Percentual de concordância = 86,1%

Fonte: Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS

APÊNDICE I – Percentual médio de colágeno por amostra, em polpa coronária de molares de ratos, das lâminas histológicas coradas com Picrossírius, nos grupos experimentais e controles.

GRUPO – AMOSTRA	MOLAR	MÉDIA DO % DE COLÁGENO
G1-1	1º	15,21
G1-2	1º	30,73
G1-3	2º	15,01
G1-4	2º	17,61
G1-6	1º	31,08
G1-7	3º	22,16
G1-8	3º	31,92
G1-9	2º	26,12

G1-10	2°	51,15
G1-11	2°	24,43
G1-13	3°	50,12
G1-14	1°	14,50
G1-15	3°	38,21
G2-2	1°	45,67
G2-3	1°	28,62
G2-4	1°	67,34
G2-6	1°	79,69
G2-7	1°	56,55
G2-9	2°	14,21
G2-10	1°	46,93
G2-11	1°	41,12
G2-13	1°	44,95
G3-1	1°	49,41
G3-5	1°	34,53
G3-7	1°	25,04
G3-8	1°	42,02
G3-12	1°	43,58
G3-13	2°	28,90
G3-15	2°	24,83
G4-2	1°	34,21
G4-4	2°	33,15
G4-9	1°	70,84
G4-10	2°	15,49
G4-11	1°	23,02
G4-14	2°	57,85

ANEXO

ANEXO A

*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 01 de dezembro de 2003

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0106/03

Intitulado: *Efeito da radioterapia em polpa coronária de dentes de ratos - análise em microscopia óptica e eletrônica de transmissão*

do(a) aluno(a): *Fabiana Vieira Vier*

Programa de: *Estomatologia Clínica*

do curso de:

Nível: *Doutorado*

Orientado pelo(a): *Profa. Dra. Maria Antonia Z. de Figueiredo*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 27 de novembro de 2003.

Profa. Dra. Elaine Bauer Veeck
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)