



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
CURSO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCOMAXILOFACIAL

EFEITO DA TELETERRAPIA FRACIONADA POR COBALTO-60 EM
MANDÍBULA DE RATO: ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE LUZ

AUDREI PELISSER

CANOAS – RS

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AUDREI PELISSER

**EFEITO DA TELETERRAPIA FRACIONADA POR COBALTO-60 EM
MANDÍBULA DE RATO: ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE LUZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Curso de Odontologia da Universidade Luterana do Brasil, como requisito final para obtenção do título de mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientadora: Profa. Dra. Vania Regina Camargo Fontanella

CANOAS – RS

2006

Dedico este trabalho à minha filha Amanda, à esposa Fabiana, aos meus pais Ambrósio e Neusa e ao meu irmão Adatao, uma família sempre presente no meu aprendizado.

AGRADECIMENTOS

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

A **Ambrósio Pelisser**, exemplo de pai e colega de profissão. Desejo dar à minha filha o amor, a atenção, os ensinamentos e a educação que recebi de você. Pai, muito obrigado pelo apoio incondicional em toda a minha formação. Você guia minha carreira profissional.

A **Neusa Giongo Pelisser**, exemplo de mãe e, agora, colega (professora). São suas, também, as palavras dirigidas ao pai. Quando aluno seu, encantava-me com seu jeito alegre e competente de ensinar. Almejo ministrar aulas como a senhora.

A **Fabiana Vieira Vier Pelisser**, minha esposa, pelo incentivo, apoio e participação no decorrer deste curso. Como exemplo de mestre foste a co-orientadora desta dissertação e a principal razão pela qual realizei este mestrado.

A **Amanda**, minha filha, pela alegria de ser pai e por ter me feito sentir a grandeza do amor paterno.

A **Adauto Pelisser**, por ser irmão e amigo. Estudamos, nos formamos e, agora, colhemos os frutos de nosso esforço.

Aos sogros, **João Flávio Vier** e **Janete Vieira Vier**, pela acolhida e apoio em todo o tempo de convivência.

A minha Orientadora, **Prof^a. Dr^a. Vania Regina Camargo Fontanella**, exemplo de professora, dedicada e prestativa. Recebeu-me de braços abertos, orientando-me na elaboração deste trabalho.

A **Prof^a. Dr^a. Tânia M. Pereira Isolan**, pela acolhida, por me ensinar a compreender o significado de ser mestre. Obrigada pelos ensinamentos e pela oportunidade de acompanhá-la nas aulas da graduação. Você, com calma e experiência, me orientou, corrigiu e incentivou. É difícil mensurar o que a senhora significou no meu mestrado. No entanto, tenho a certeza de que foste fundamental neste curso.

Ao **Programa de Mestrado em CTBMF da Ulbra**, em especial aos professores **Dr. Pedro Hernandez** e **Dr. Aurelício Novaes Junior** por contribuírem com a minha formação.

Aos professores, **Sandro Guasseli** e **Paulo Presser**, pelo incentivo e presença durante o mestrado.

Ao **Programa de Doutorado em Estomatologia Clínica da PUCRS**, em especial à **Dr^a. Liliane Soares Yurgel**, por ter me autorizado a compartilhar a fase experimental do projeto de pesquisa desenvolvido pela **Dr^a. Fabiana Vieira Vier Pelisser**.

Ao **Serviço de Radioterapia da PUCRS (SERP)**, na pessoa do **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 disponibilizarem 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**.

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.

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

“Um excelente educador não é um ser humano perfeito, mas alguém que tem serenidade para se esvaziar e sensibilidade para aprender”.

Augusto Cury

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito imediato e tardio (30 dias) da teleterapia fracionada, por cobalto-60, sobre o percentual médio de lacunas osteocíticas vazias, em mandíbula de ratos. Estes eram albinos (n=45) de espécie, idade e peso semelhantes, sendo divididos em três 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; grupo 3 (n=15), não irradiado, servindo como grupo-controle. O protocolo radioterápico consistiu de 30 sessões de teleterapia na região de cabeça, fracionadas em doses de 200 cGy/dia, totalizando 60 Gy. Após a perfusão dos animais com paraformaldeído a 4%, a hemimandíbula esquerda foi dissecada e processada histologicamente. Secções seriadas (5µm) foram obtidas e coradas com HE. Selecionaram-se duas áreas próximas às raízes dos primeiros e segundos molares. O percentual médio de lacunas osteocíticas vazias foi mensurado, em duplicata, por um único avaliador, valendo-se do programa Image Tool. A ANOVA, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, verificou que os grupos irradiados 1 e 2 não diferiram entre si, apresentando maiores percentuais de lacunas osteocíticas vazias (P=0,005) quando comparados com o grupo controle. Concluiu-se que a teleterapia fracionada por Co⁶⁰, na dose estabelecida, provoca uma diminuição na celularidade do tecido ósseo mandibular de ratos.

Palavras-chave: teleterapia por radioisótopo, ratos, cabeça, mandíbula, microscopia

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the immediate and subsequent 30-day effect of Cobalt 60 fractionated radiotherapy over the average percentage of empty osteocyte lacunae in rat mandibles. Forty-five albino rats of similar species, age and weight were divided into three groups of 15 specimens each. Group 1 – the specimens were submitted to fractionated radiotherapy (60 Gy) and sacrificed following the last radiation dosage. Group 2 – the specimens were submitted to the same procedure as in Group 1, though sacrificed 30 days after concluding radiotherapy. Group 3 – control group consisting of specimens which were not submitted to radiotherapy. The radiotherapy protocol consisted of a course of 30 radiotherapy sessions performed on the head, fractionated in 200 cGy/day and totalling 60 Gy. After perfusing the specimens with 4% paraformaldehyde, the left-half mandible was excised and histologically processed then cut into 5µm sections and dyed with HE. Two areas near the first and second molar roots were selected. One single operator employing the Image Tool program measured twice the average percentage of empty osteocyte lacunae. The ANOVA test supplemented with Tukey's Multiple Comparison Test, statistically significant at 5%, indicated that Groups 1 and 2, submitted to radiotherapy, showed no difference and presented greater percentages of empty osteocyte lacunae ($P=0.005$) when compared to the control group. It is possible to conclude that Cobalt 60 fractionated radiotherapy used at the established dosage reduces the cellularity of rat mandible bone tissue.

Keywords: isotope radiotherapy, rats, head, mandible, 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.....	34
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. cânula <i>intracath</i> no ventrículo esquerdo; h. nó duplo na aorta ascendente; i. incisão no átrio direito.....	37
Figura 3-	Hemimandíbula de rato. O fragmento delimitado pelas linhas foi destinado a Microscopia de luz.....	38
Figura 4 -	a. Imagem selecionada; b. divisão em quadrantes para facilitar a visualização; c. Selecionando a ferramenta <i>Count and Tag</i> ; d. osteócitos e lacunas osteocíticas vazias sendo marcados e contados.....	40
Figura 5 -	Fotomicrografia de tecido ósseo mandibular de animal do grupo 1 (G1). As regiões em destaque, nos cantos superior esquerdo e inferior direito, revelam, respectivamente, presença de alteração nuclear no endotélio e osteócitos. com alteração nuclear. HE. Aumento 200X.....	44
Figura 6 -	Fotomicrografia de tecido ósseo mandibular de animal do grupo 2 (G2). A região em destaque revela a presença de lacunas osteocíticas vazias(*). HE. Aumento 200X.....	44
Figura 7 -	Fotomicrografia de tecido ósseo mandibular de animal do grupo 3 (não irradiado)(G3). HE. Aumento 200X.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Percentagem média de lacunas osteocíticas vazias em tecido ósseo mandibular de ratos corados com HE, nos grupos experimentais e controle. Canoas, 2006.....	43
Tabela 2 -	Tabela da Análise de Variância do percentual médio de lacunas osteocíticas vazias em tecido ósseo mandibular de ratos corados com HE, nos grupos experimentais e controle. Canoas, 2006.....	43

ANEXOS

Anexo A	Aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUC/RS.....	61
Anexo B -	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da ULBRA.....	62
Anexo C -	Carta do Programa de Pós graduação da PUCRS ao CEP da ULBRA.....	63
Anexo D -	Carta da Orientadora da pesquisa intitulada “Efeito da radioterapia em polpa coronária de dentes de ratos- análise em microscopia óptica e eletrônica de transmissão” ao CEP da ULBRA.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de Variância

°C – grau Celsius

Co⁶⁰ – cobalto-60

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

cm – centímetro

DCM – Departamento de Ciências Médicas

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etileno-diamino-tetracético

G¹ – intervalo 1

G² - intervalo 2

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 - mitose

mg – miligrama

ml – microlitro

mm³ – milímetro cúbico

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

μm – micrômetro

μm² – micrômetro quadrado

nm – nanômetro

ORN – Osteorradionecrose

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

R - fase de restrição

RNA - ácido ribonucléico

RS – Rio Grande do Sul

S – fase de síntese

SERP – Serviço de Radioterapia

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UI – Unidades Internacionais

ULBRA – Universidade Luterana do Brasil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
3	PROPOSIÇÃO	29
3.1	OBJETIVO	30
3.2	HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	DELINEAMENTO	32
4.2	LINHA DE PESQUISA	32
4.3	VARIÁVEIS	32
4.3.1	Dependentes	32
4.3.2	Independentes	32
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	32
4.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
4.6	PROCEDIMENTOS	33
4.6.1	Manutenção dos modelos animais	33
4.6.2	Protocolo da radioterapia	33
4.6.3	Eutanásia dos animais	35
4.6.4	Preparo e avaliação histológica dos espécimes	38
4.6.5	Avaliação dos espécimes	39
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	40

5	RESULTADOS	41
5.1	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ESPÉCIMES	42
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	52
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
	ANEXOS	60

1. INTRODUÇÃO

A radioterapia, modalidade utilizada para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço (SILVA; ARRUDA, 2004), 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, hipossalivação, limitação do grau de abertura bucal, diminuição da qualidade da função mastigatória e disgeusia (SEGRETO; SEGRETO, 2000; VISSINK et al., 2003).

Apesar de inúmeras publicações mencionarem a ocorrência de hipóxia, hipocelularidade e hipovascularidade no tecido ósseo irradiado (MARX, 1983; NEVILLE et al., 1998; STORE e OLSEN, 2005; STORE et al., 2005), poucos são os estudos (ROHRER et al., 1979) que avaliaram, de forma quantitativa, a alteração do número de osteócitos neste tecido

As alterações oriundas da ação da radiação ionizante no tecido ósseo, que oportunizem o desenvolvimento da osteorradionecrose, considerada a mais grave complicação da radioterapia na região de cabeça e pescoço (DE MOOR, 2000) devem ser estudadas.

Assim, baseado nas informações supracitadas e motivando o desenvolvimento deste estudo, questiona-se a capacidade da teleterapia fracionada, na região de cabeça, ser capaz de promover efeitos deletérios imediatos e/ou tardios em mandíbula de ratos, no que diz respeito ao percentual médio de lacunas osteocíticas vazias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, cujo peso consiste em 33% de matriz orgânica, dos quais 28% consistem em colágeno tipo I e 5% em proteínas não-colagenosas. A matriz orgânica é permeada por cristais de hidroxiapatita, que perfazem os 67% remanescentes. Quando maduro, o tecido ósseo é constituído de camadas ou lamelas microscópicas, as quais, no osso compacto, estão densamente arranjadas. Três tipos distintos de arranjos podem ser reconhecidos: circunferencial, concêntrico e intersticial. As lamelas circunferenciais envolvem todo o osso adulto, formando o seu perímetro externo. As lamelas concêntricas constituem a massa do osso compacto e forma a sua unidade metabólica básica, o ósteon, o qual tem formato cilíndrico e, geralmente, está orientado paralelo ao longo eixo da peça óssea. No centro de cada ósteon existe o canal haversiano, que aloja um capilar e se apresenta revestido por uma camada única de células ósseas recobrendo a sua superfície. Os canais haversianos adjacentes estão interconectados pelos canais de Volkmann. Interpostas entre camadas concêntricas adjacentes e preenchendo os espaços entre elas, encontram-se as lamelas intersticiais, as quais apresentam uma grande variedade de formas (WHITSON, 2001).

As células responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da osteoarquitetura são, respectiva e basicamente, os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos (WHITSON, 2001).

Os osteoblastos são células que sintetizam a porção orgânica do tecido ósseo. Quando em intensa atividade, são cubóides, com citoplasma muito basófilo. Contudo, em estado pouco ativo, tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui. Uma vez aprisionado na matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado osteócito. Esses são células achatadas, com forma de amêndoa, que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi diminuto e núcleo com cromatina condensada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O número de osteoblastos que se tornam osteócitos varia de acordo com a velocidade da formação do osso. Após sua formação, os osteócitos gradualmente diminuem a formação de matriz e tornam-se reduzidos em tamanho. O espaço na matriz ocupado por um osteócito é chamado de lacuna osteocítica. Estreitos prolongamentos dessas lacunas formam canais, ou

canalículos, que abrigam os prolongamentos citoplasmáticos destas células. Dessa maneira, os osteócitos mantêm contato com osteócitos adjacentes, osteoblastos, periósteo, endósteo e canal haversiano. Essa ligação é necessária à manutenção e vitalidade da matriz óssea. Uma falha em qualquer ponto desse sistema de interconexão, resulta na hipermineralização e morte do osso. Tal osso é reabsorvido e recolocado durante o processo de renovação óssea (WHITSON, 2001).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas, com partes dilatadas, que contêm de seis a cinquenta núcleos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A maior parte dos tecidos estruturais passa por um período de vida, morte e substituição por novas células. O tecido ósseo apresenta reabsorção e remodelação, com perda de osteócitos e novos osteóides produzidos pelos osteoblastos diariamente. De maneira similar, a estrutura de colágeno sofre lise e substituição. Nos tecidos irradiados, a habilidade de substituir a perda do colágeno e a perda das células normais fica severamente comprometida ou inexistente (MARX, 1983).

Para Marx e Johnson (1987), o entendimento dos efeitos da radiação nas células depende da compreensão do ciclo celular, pois a radiosensibilidade está correlacionada com o estágio da célula no momento da exposição.

O ciclo celular compreende os processos que ocorrem desde a formação de uma célula até a sua própria divisão. As quatro fases sucessivas do ciclo de divisão de uma célula são chamadas de G^1 , S, G^2 e M. No início da fase G^1 , em resposta a sinais externos, a célula decide se continua em ciclo ou assume um estado quiescente chamado G^0 . Desse estado, ela pode voltar ao ciclo mediante estímulo. No final de G^1 existe um importante ponto de controle de ciclo, chamado de ponto de restrição (R), que impede a progressão do ciclo em condições desfavoráveis ou insatisfatórias. Quando o ponto R é ultrapassado, a célula atravessa as demais fases até que duas células-filhas idênticas sejam formadas ao final da mitose (JORDÃO; ANDRADE, 2000).

A fase de mitose (M) é extremamente sensível à radiação, pois existe grande possibilidade de fixação da lesão radioinduzida. Acredita-se que este fato ocorra devido à grande compactação do ácido desoxirribonucléico (DNA).

Isto aumenta a probabilidade de interação, provocando aberrações cromossômicas e morte celular. A grande compactação da cromatina torna as lesões inacessíveis às enzimas reparadoras. A fase de síntese (S) é a menos sensível à radiação, possivelmente devido à duplicidade do conteúdo informacional, o que poderia viabilizar a atuação dos mecanismos de reparo. A radiação provoca retardo em G^2/M . Acredita-se que isso aconteça para haver o reparo da lesão radioinduzida, antes da divisão celular (JORDÃO; ANDRADE, 2000).

Baker (1982) relatou que a resposta dos tecidos à radiação está relacionada com a capacidade da célula de 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, tecido linfóide e certos tumores. Associa-se à resposta rápida destes tecidos a alta atividade mitótica e a grande susceptibilidade à apoptose. Os tecidos de resposta lenta são aqueles que apresentam alterações mais tardias. São exemplos os tecidos ósseo, conjuntivo, muscular e nervoso, que possuem baixa atividade proliferativa.

Associa-se à resposta lenta a morte clonogênica e a menor susceptibilidade à apoptose (SEGRETO; SEGRETO, 2000). A reação aguda da mucosa do epitélio oral se traduz pela mucosite, enquanto que efeitos crônicos estão intimamente relacionados a prejuízo no leito vascular terminal, relacionado ao dano na microcirculação e ao estroma de suporte, sendo caracterizado por telangiectasia, oclusão de capilares devido ao espessamento das paredes dos vasos sanguíneos, aumento da hialinização e deposição fibrosa (BAKER, 1982).

As radiações ionizantes podem afetar direta ou indiretamente os tecidos. O efeito direto é exercido sobre componentes celulares como o DNA, ácido ribonucléico (RNA), proteínas e lipídeos. O indireto é causado pela ionização da água, que resulta na formação de radicais livres, os quais podem reagir com substâncias biologicamente importantes (MARX; JOHNSON, 1987; SEGRETO; SEGRETO, 2000; LANGLAND; LANGLAIS, 2002). Entre as alterações radioinduzidas, as quebras duplas do DNA são as mais prejudiciais, podendo levar as células à morte (SEGRETO e SEGRETO, 2000; STONE et al, 2003).

Lesões 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).

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 irradiação, isoladamente ou por sua associação com a cirurgia (REGEZI; SCIUBBA, 2000). A radioterapia é efetiva, tanto para neoplasias malignas localizadas, quanto avançadas, na região de cabeça e pescoço (SILVA; ARRUDA, 2004).

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, habitualmente, fracionada em doses diárias de cerca de 2 Gy, o que permite distribuir, num período de quatro a sete semanas, a dose total recomendada (REGEZI; SCIUBBA, 2000).

A escolha da modalidade terapêutica radioterapia, quimioterapia, cirurgia, combinadas ou isoladamente, é ditada por fatores tais como: a idade e a condição sistêmica do paciente, o tamanho, a localização e o tipo de tumor a ser tratado (SILVERMAN; CHIERICI, 1965; BLOZIS; ROBINSON, 1968). 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 (SILVA; ARRUDA, 2004).

A forma de irradiação, denominada teleterapia, utiliza aparelhos colocados distantes do paciente, como máquinas de supervoltagem, fontes de cobalto-60 (Co^{60}) ou aceleradores lineares ou de partículas (HELLMAN, 1997; DIAS; MACULEVICIUS, 2004). A teleterapia atravessa estruturas importantes antes de alcançar o sítio tumoral. Conseqüentemente, tecidos como glândulas salivares e osso podem ser expostos a altas doses de radiação (BEUMER; BRADY, 1978).

As modalidades de radioterapia diferem pela quantidade de energia da radiação utilizada (BLOZIS; ROBINSON, 1968). Os níveis de energia utilizados na prática clínica são classificados em superficial (10 - 125 KeV), ortovoltagem

(125 - 400 KeV), supervoltagem (400 KeV – 2 MeV) e megavoltagem (> 2 MeV[V_{F1}]) (MATHES; ALEXANDER, 1996).

A ortovoltagem possui um alto coeficiente de absorção no osso e na pele (GEHRIG, 1969), devido ao predomínio do efeito fotoelétrico (MATHES; ALEXANDER, 1996). A absorção da radiação aumenta quando o número atômico dos elementos que compõem o tecido exposto aumenta, o que explica porque o osso absorve mais energia do que o tecido mole em energias fotoelétricas baixas (HELLMAN, 1997). Devido à densidade elevada e ao alto número atômico do tecido ósseo, uma alta dose radioativa é liberada para seus componentes celulares, a menos que a energia da radiação esteja em limites de megavoltagem (BAKER, 1982).

Com o uso aumentado da supervoltagem, o número de complicações radioterápicas parece ter diminuído (BLOZIS e ROBINSON, 1968). A supervoltagem emprega, tanto os raios X, quanto os gama. Os primeiros são produzidos por um equipamento que gera energia de até 2 milhões de elétrons. A origem dos raios gama, com energia de 1,17 a 1,33 MeV, é o Co⁶⁰ alojado em uma estrutura blindada (WANG, 1978), freqüentemente usado devido ao seu baixo custo e à confiabilidade mecânica (BLOZIS; ROBINSON, 1968). A alta velocidade dos fótons faz com que a energia dos mesmos não seja prontamente absorvida no tecido ósseo, produzindo neste um efeito deletério cerca de 20 a 30% menor do que quando do emprego da ortovoltagem (GEHRIG, 1969).

Com a introdução do Co⁶⁰ 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 destrutivas importantes nos ossos maxilares e na mucosa oral. Meyer, Shklar e Turner (1963) compararam o efeito da ortovoltagem (200 kV) e da supervoltagem (Co⁶⁰) em 70 ratos, com três meses de idade, empregando as seguintes doses: 10Gy, 15Gy e 20Gy. O tecido ósseo foi estudado na região do septo interdental, entre o primeiro e segundo molar inferior. Esta é uma região com alta sensibilidade às influências sistêmicas, podendo ser estudada em termos de atividade dos osteoblastos e osteoclastos. No grupo controle, o septo interdental foi visto como uma estrutura óssea estreita, unida ao cimento dentário por fibras do ligamento periodontal. A superfície distal do septo apresentou uma linha

homogênea com numerosos osteoblastos. Já na superfície mesial havia irregularidades e alguns osteoclastos foram evidenciados. Aposição óssea na superfície distal e reabsorção na mesial refletem a tendência normal dos dentes de ratos de deslocarem-se para distal. Nos animais que receberam ortovoltagem o osso apresentou-se de forma irregular, com sítios degenerativos. Picnose foi observada nos osteócitos. Não foi evidenciada a presença de osteóide na margem distal do septo e considerável redução no número de osteoblastos foi observada. A membrana periodontal mostrou uma redução no número de fibroblastos. Os espaços no tecido medular estavam aumentados, entretanto, espaços medulares mostraram uma redução na densidade dos componentes celulares. Nos animais irradiados com Co^{60} o osso mostrou-se essencialmente normal. Ocasionalmente, alguns animais mostraram redução no número de osteoblastos e fibroblastos adjacentes à membrana periodontal.

Apesar dos avanços das técnicas radioterápicas, complicações ainda são comuns. 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 com fibrose e diminuição na vascularização, que podem levar à necrose tecidual, infecção e ulceração (MATHES; ALEXANDER, 1996).

Um certo grau de injúria tecidual é considerado ônus aceitável para o controle do tumor letal. Os limites de aceitação variam em diferentes sítios, mas a integridade e a viabilidade dos tecidos devem ser mantidas (MARX; JOHNSON, 1987).

Deve-se assegurar que a dose de radiação no osso não exceda sua tolerância. Por tolerância está compreendida a injúria máxima que pode ser suportada, sem resultar em um permanente e inaceitável defeito cosmético ou perda funcional. Se o paciente está em um estado excelente de saúde oral, a mandíbula tolerará uma dose de aproximadamente 60 Gy, fracionada em 30 a 35 vezes por 6 a 7 semanas, sem exceder a tolerância (CHENG; WANG, 1974).

Assim, além dos efeitos terapêuticos da radiação, complicações específicas da radioterapia na região de cabeça e pescoço são: cárie e mucosite radioinduzidas, candidíase, risco de osteorradionecrose (ORN),

xerostomia, limitação da abertura bucal, diminuição da qualidade da função mastigatória, disgeusia e tolerância diminuída ao uso de próteses totais (SILVERMAN; CHIERICI, 1965; BEUMER; BRADY, 1978; BROWN et al., 1990; DE MOOR, 2000; SEGRETO; SEGRETO, 2000; VISSINK et al., 2003). A avaliação das condições orais, tanto prévias quanto durante o tratamento radioterápico, pode diminuir a ocorrência dessas complicações (BEUMER; BRADY, 1978; BROWN et al., 1990).

O efeito secundário da radioterapia de cabeça e pescoço mais temido é a ORN (SOARES; MARLUCCI, 1996; MARX, 1983; MARX; JOHNSON, 1987; DE MOOR, 2000). A ORN mandibular é um exemplo de dano por radiação ao osso, com uma incidência variando de 2 a 14 % (CHENG; WANG, 1974; RANKOW; WEISSMAN, 1971). Nos pacientes tratados cirurgicamente para remoção da neoplasia e submetidos à radioterapia complementar, esta incidência varia de 0,4% a 56% (JERECZEK-FOSSA; ORECCHIA, 2002).

Marx (1983) definiu a ORN como uma deficiência metabólica e hemostática dos tecidos, decorrente da injúria tecidual induzida pela irradiação.

A ORN é caracterizada pela seqüência: radiação, hipóxia, hipovascularização e hipocelularidade dos tecidos. A irradiação causa comprometimento do endotélio, hialinização e trombose dos vasos. O periósteo torna-se fibrótico. Os osteócitos e osteoclastos tornam-se necróticos por fibrose dos espaços medulares (MARX, 1983; NEVILLE et al., 1998; STORE e OLSEN, 2005; STORE et al., 2005).

O osso irradiado, como parte do tratamento do câncer de cabeça e pescoço, é particularmente suscetível à infecção. Devido à vascularização reduzida e destruição dos osteócitos, a ORN ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes que sofreram irradiação local (REGEZI e SCIUBBA, 2000).

Para Sykes (2001), as células ósseas e a vascularização tecidual tornam-se irreversivelmente lesadas quando irradiadas, com conseqüente desvitalização do tecido ósseo, fato que torna susceptível o desenvolvimento da ORN.

Thorn et al. (2000) realizaram uma investigação clínica em 80 pacientes que apresentaram ORN. Observaram que 74% deles desenvolveram a doença nos primeiros três anos, sendo que somente em um caso a lesão não estava no campo da radiação. Nos demais casos, a predileção foi pela região de

molares inferiores (82%). Os autores ainda investigaram alguns fatores associados ao início da ORN. Em 55% dos casos a mesma esteve associada à exodontia prévia e, em 29%, a causa foi aparentemente espontânea.

Reuther et al. (2003) realizaram um estudo retrospectivo objetivando demonstrar a incidência da ORN, num grupo de 830 pacientes que se submeteram à radioterapia de cabeça e pescoço, entre 1969 e 1999. Os dados mostraram uma incidência de 8,2%, sendo maior nos homens do que nas mulheres e, comumente, encontrada na mandíbula. Também para Thorn et al. (2000) e Ang et al. (2003), o local preferencial para o desenvolvimento da ORN é o osso mandibular.

Rohrer et al. (1979) avaliaram os efeitos de altas doses de radiação na mandíbula de oito macacos. Os animais foram irradiados com uma dose total de 45 Gy de Co^{60} , fracionada em 10 sessões, por um período de 12 dias, o equivalente a 70 Gy, divididos em 35 sessões por sete semanas. Os animais foram sacrificados no período de uma semana a seis meses, após o término do tratamento. Foram realizados cortes histológicos na região de molares (localizada no campo de irradiação) e na região de incisivos (local não irradiado). A região de molares foi subdividida em osso cortical, haversiano e medular. Em cada corte histológico, a percentagem de lacunas vazias foi registrada. Os osteócitos estavam ausentes nas lacunas da cortical óssea externa e no osso haversiano, apresentando valores médios de 35% e 32%, respectivamente. A presença de lacunas vazias foi mais marcante a partir do terceiro mês. Contudo, no osso medular os valores foram semelhantes aos do grupo controle. A porção medular das mandíbulas irradiadas sofreu marcada proliferação. O ligamento periodontal tornou-se densamente hialinizado, com perda da organização das fibras principais, demonstrando mudanças vasculares. Os canais haversianos demonstraram alterações que variaram, desde a obliteração de vasos sanguíneos, até o completo fechamento dos canais com tecido osteóide. No grupo controle, os canais haversianos continham uma veia, uma ou duas arteríolas e pouco tecido conjuntivo. Nos animais irradiados, as mudanças incluíram o estreitamento da luz dos vasos, atribuído -à presença de placas fibrosas e ao aumento da quantidade de fibras conjuntivas no seu interior. O perióstio, no interior do campo da irradiação, exibiu perda de celularidade, de vascularização e de formação de osteóide. A

medula dos animais irradiados mostrou mudanças notáveis, incluindo fibrose, proliferação de novo osso e endoarterite obliterante. Para os autores, a diferença no percentual de lacunas vazias, nas diferentes regiões do tecido ósseo, pode ser decorrente da capacidade regenerativa e da variação do suprimento sanguíneo, em cada local. A habilidade de regeneração também depende da anatomia óssea e da localização das células mesenquimais indiferenciadas.

As mudanças iniciais no osso resultam na redução da população de osteócitos. Osteoblastos tendem a ser mais radiosensíveis do que os osteoclastos, tanto que, depois de um curso de radioterapia, deve haver uma maior desproporcionalidade da atividade lítica. Com redução excessiva nos osteócitos, regiões do osso tornam-se desvitalizadas e mudanças degenerativas começam a se desenvolver. Essas mudanças são potencializadas porque a radiação também acarreta injúrias a pequenos vasos sanguíneos do osso, assim como à mucosa oral (BAKER, 1982).

Doses terapêuticas de radiação causam morte do endotélio, trombose e hialinização dos vasos sanguíneos. Há uma progressiva obliteração dos vasos levando a diminuição da microcirculação. O perióstio fica fibroso, os osteoblastos e osteócitos são destruídos e aparecem espaços na medula óssea, bem como o seu preenchimento por tecido fibroso. Há diminuição da celularidade de todos os tecidos e a vascularização fica marcadamente diminuída (LAMBERT et al., 1997).

Takekawa, Matsuda e Ohotubo (2000) realizaram um estudo em ratos, avaliando o processo de cicatrização de enxertos ósseos, em áreas irradiadas com Co^{60} . Os autores realizaram cirurgias de transplante de tecido ósseo da crista ilíaca para o osso parietal, após a segunda (A) e quarta (B) semana do término da radioterapia. Os resultados da cirurgia A mostraram pouca presença de células mesenquimais e vasos sanguíneos ao redor do transplante, quando avaliada na segunda semana. Contudo, na avaliação realizada na quarta semana após a cirurgia, o resultado não foi diferente ao do grupo controle. No outro grupo (B), que realizou o enxerto quatro semanas após a radioterapia, a evolução da cicatrização foi similar ao do grupo controle. O atraso na cicatrização óssea foi causado pelo retardo na revascularização, decorrente de falhas na microcirculação, bem como, pelo dano às células osteogênicas.

Contudo, o reparo ocorreu com o passar do tempo, pelo processo fisiológico de renovação celular.

Com base nesta breve revisão de literatura, percebe-se que a radiação na região de cabeça e pescoço provoca danos na vascularização e no grau de celularidade do tecido ósseo, que se torna potencialmente susceptível à ORN. Assim, o estudo do efeito imediato e tardio (30 dias), da teleterapia fracionada por Co^{60} , sobre o percentual médio de lacunas osteocíticas vazias, em mandíbula de ratos, torna-se importante para o melhor entendimento deste processo.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar o percentual médio de lacunas osteocíticas vazias no tecido ósseo mandibular de ratos expostos a teleterapia fracionada por Cobalto-60, eutanasiados ao final do esquema radioterápico e aos 30 dias subseqüentes, comparando os resultados com animais não submetidos a radioterapia.

3.2 HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

- A teleterapia fracionada por Cobalto-60 promove, no tecido ósseo mandibular de ratos, um aumento no percentual médio de lacunas osteocíticas vazias percebido imediatamente após o término do esquema radioterápico.
- A teleterapia fracionada por Cobalto-60 promove, no tecido ósseo mandibular de ratos, um aumento no percentual médio de lacunas osteocíticas vazias, sendo está alteração percebida trinta dias após o término do esquema radioterápico.
- A teleterapia fracionada por Cobalto-60 não promove, no tecido ósseo mandibular de ratos, um aumento no percentual médio de lacunas osteocíticas vazias, percebido imediatamente após e aos trinta dias subseqüentes ao término do esquema radioterápico.

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 et al., 2002).

4.2 LINHA DE PESQUISA

O presente experimento insere-se na Linha de Pesquisa denominada “Epidemiologia e etiopatogenia das doenças e disfunções do sistema estomatognático”.

4.3 VARIÁVEIS

4.3.1 Dependentes

a) presença de lacunas osteocíticas vazias

4.3.2 Independentes

a) radioterapia na região de 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, com 80 dias de idade, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, pesando entre 220 e 290g no início do experimento. A aquisição desses animais procedeu-se no Biotério da UFRGS, Porto Alegre/RS.

A realização da parte experimental desse trabalho foi iniciada após a aprovação do Projeto de Pesquisa pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUC/RS, (Anexo 1) e as lâminas foram avaliadas após o consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da Faculdade de Odontologia da ULBRA (Anexo 2).

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais deste experimento foram divididos em três 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) – quinze animais não submetidos à radioterapia, subdivididos em dois grupos, eutanasiados, respectivamente, sete deles com o grupo experimental 1 e oito com o 2.

4.6 PROCEDIMENTOS

4.6.1 Manutenção dos modelos animais

Os animais de cada grupo foram identificados com cores distintas na cauda e acomodados em gaiolas específicas (Figura 1a), divididos em grupos de cinco. 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 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 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 de cabeça dos animais foi irradiada no SERP, através da utilização de aparelho² de teleterapia por Co^{60} (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 200cGy/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

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

² Philips, modelo XK 5101, Eindhoven, Netherlands; fonte de Co^{60} : Janeiro/1979, Ottawa, Canadá



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.

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 20cm.

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 à mandíbulas ficasse expostas à radiação (Figura 1f). Essa disposição foi adaptada da metodologia descrita por English et al. (1954) e por English (1956).

O protocolo do tratamento radioterápico (SAGOWKI 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 mortos no Laboratório de Neuroanatomia, DCM, ICBS da UFRGS. O transporte dos ratos foi feito no interior de suas gaiolas, em veículos terrestres, locomovendo-se em velocidade e condições apropriadas.

Visando obter uma melhor fixação do tecido ósseo, 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.

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 pele do ventre do animal, desde a região limítrofe 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 eixo do animal, o tecido de revestimento abaixo do externo, na altura do

³ Thionembatal, Illinois, EUA

⁴ Ketamin-S +, Itaparica, SP, Brasil

osso esterno. Após o rebatimento, 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 uma 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 do animal. 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 uma cânula de *intracath*⁸ (Figura 2g), até que a mesma fosse percebida 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.

Antes do emprego da solução fixadora, o sistema circulatório da cabeça dos animais foi lavado com 50ml de tampão de fosfato 0,1M, pH 7.3 (Tampão Millonig 2 vezes concentrado). Para tanto, uma seringa luer lock⁹ foi acoplada na porção terminal da cânula *intracath*, permitindo o acesso das substâncias ao sistema circulatório do animal. A seguir, 50ml de solução de paraformaldeído a 4% 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, realizou-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 microscopia de luz (Figura 3).

⁵ BD Ultra-FineTM, Franklin, NJ, EUA

⁶ Lique mine, Roche, Basileia/Suíça

⁷ Injecta, Diadema, SP, Brasil

⁸ B-D, Curitiba, PR, Brasil

⁹ B-D, Curitiba, PR, Brasil

¹⁰ KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil

¹¹ Kavo, Joinville, SC, Brasil

¹² Beltec, Araraquara, SP, Brasil

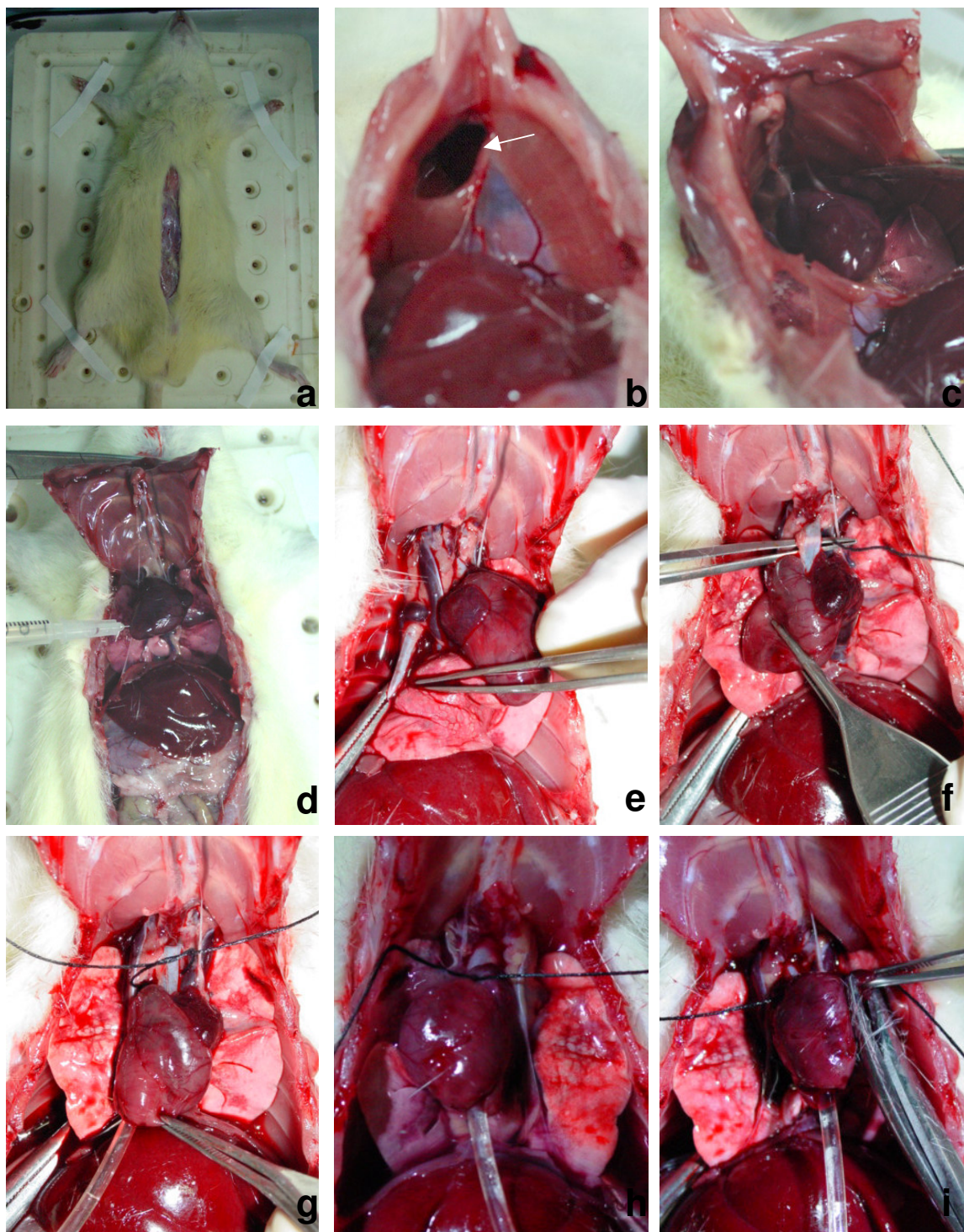


Figura 2 – a. Incisão no ventre do animal; b. diafragma excisado; c. corte de relaxamento nas costelas; d. aplicação de heparina no coração; e. pinçamento da aorta abdominal descendente; f. fio de sutura circundando a aorta ascendente; g. cânula *intracath* no ventrículo esquerdo; h. nó duplo na aorta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

As peças anatômicas obtidas, contendo os dentes, foram acondicionadas, individualmente, em potes plásticos identificados, contendo a solução fixadora.

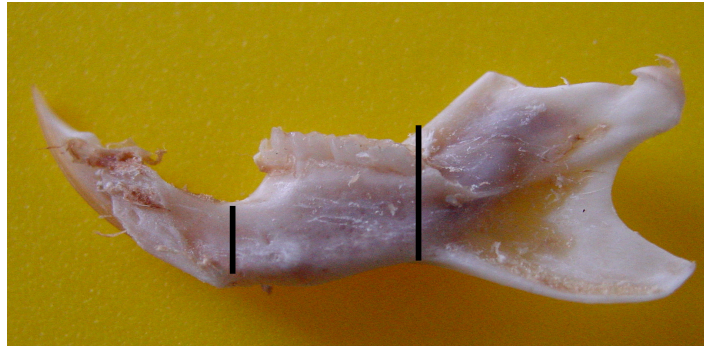


Figura 3 – Hemimandíbula de rato. O fragmento delimitado pelas linhas foi destinado a Microscopia de luz.

4.6.4 Preparo e avaliação histológica dos espécimes

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, da porção pulpar coronária, no sentido do longo eixo dentário, de 5µm de espessura, pudessem ser obtidos.

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

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

¹⁵ Nuclear, Diadema, SP, Brasil

Foram realizados três cortes semi-seriados, longitudinais, de 5µm 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 HE.

4.6.5 Avaliação dos espécimes

O local de avaliação dos cortes histopatológicos foi o osso medular, próximo as raízes dos primeiros e segundos molares inferiores esquerdos.

Em cada lâmina histológica, foram selecionadas duas áreas, correspondendo às regiões de primeiro e segundo molar. Estas foram capturadas utilizando-se um microscópio óptico²⁰ acoplado a um sistema de captação de imagens digitais²¹, com aumento de 200x e armazenadas valendo-se do programa Image-Pro Plus²².

As imagens foram inseridas no *software* ImageTool²³, visando a contagem de osteócitos e de lacunas osteocíticas vazias. Inicialmente a imagem era dividida em quatro quadrantes, para facilitar a visualização do campo. Selecionou-se a ferramenta *Tag and Count* para marcação e contagem dos osteócitos e, na seqüência, das lacunas osteocíticas vazias. Essa contagem foi repetida em duplicata para cada imagem. Os valores numéricos foram anotados em tabelas. Após, fez-se uma média aritmética das duas mensurações.

Os espécimes foram avaliados em etapas, com contagem de dez imagens diárias e, feito um intervalo de 7 dias, procedeu-se a segunda mensuração.

¹⁶ Leica 2000R, Houston, Texas, EUA

¹⁷ Bioglass, SP, Brasil

¹⁸ Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil

¹⁹ Sigma, St Louis, Missouri, EUA

²⁰ Olympus AX 70, New York, EUA

²¹ Olympus U-PMTVC, Salt Lake, Utha, EUA

²² Image-Pro Plus® (versão 4.0), Silver Spring, MD, EUA.

²³ Image Tool - UTSHCA, Texas, EUA

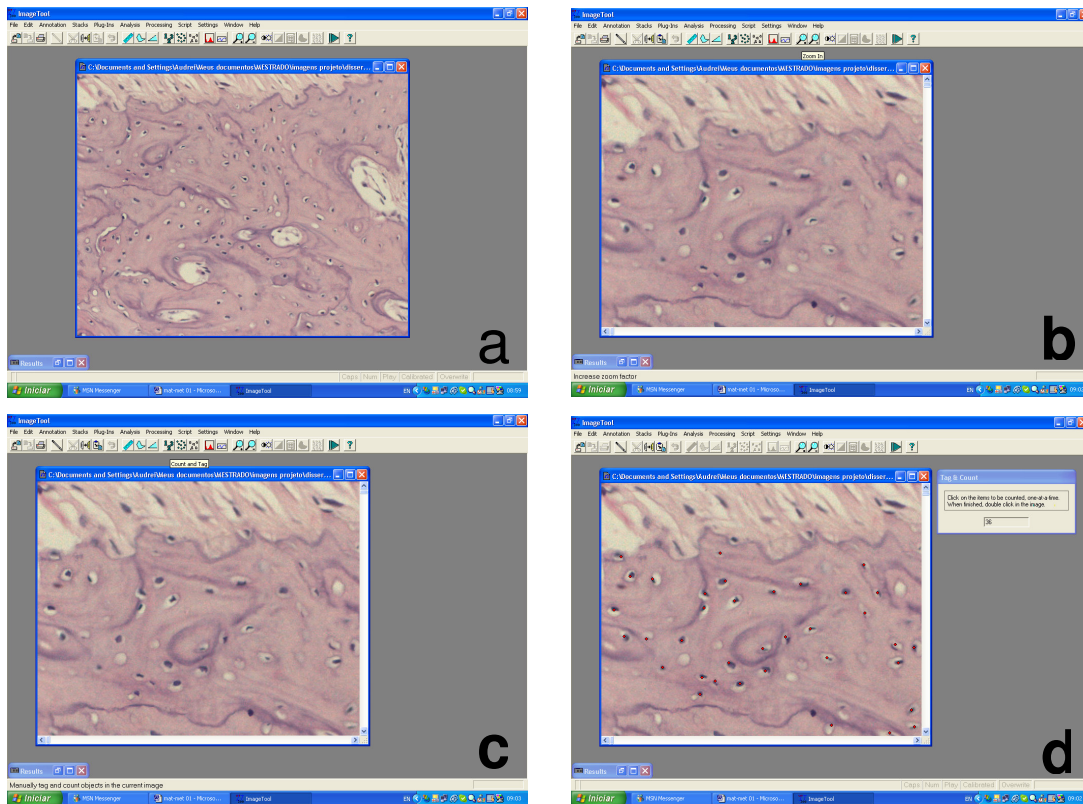


Figura 4-a. Imagem selecionada; **b.** divisão em quadrantes para facilitar a visualização; **c.** Selecionando a ferramenta *Count and Tag*; **d.** osteócitos e lacunas osteocíticas vazias sendo marcados e contados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para verificar o grau de concordância intra-examinador, entre a primeira e a segunda mensuração, utilizou-se o Coeficiente de Correlação Intraclass.

A Análise de Variância, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, foi empregada para verificação de diferença entre os grupos estudados, quanto à percentagem de lacunas osteocíticas vazias nos tecidos, valendo-se do software SPSS versão 8.0²⁴.

²⁴ Software SPSS - São Paulo, SP, Brasil

5. RESULTADOS

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 redução visível da quantidade de pêlos na cabeça, ou seja, na área do portal da radiação, fato mais claramente percebido nos animais do grupo 2, que foram mantidos até 30 dias após a conclusão da radioterapia.

5.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ESPÉCIMES

O Coeficiente de Correlação Intraclasse, verificou uma boa reprodutibilidade entre a primeira e a segunda mensuração ($r_i = 0,956$; $p < 0,001$).

Este trabalho pode constatar que os grupos 1 e 2, ou seja, irradiados, não diferiram entre si, apresentando maiores percentuais de lacunas osteocíticas vazias (Figuras 5 e 6) quando comparados ao grupo 3 (controle) (Figura 7) (Tabelas 1 e 2), isto foi comprovado pela Análise de Variância, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Tabela 1 – Percentagem média de lacunas osteocíticas vazias em tecido ósseo mandibular de ratos corados com HE, nos grupos experimentais e controle. Canoas, 2006.

Grupo	n	% de lacunas osteocíticas vazias			
		Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
G1	14*	12,69 ^A	3,95	5,92	18,83
G2	12*	12,93 ^A	4,71	3,53	20,67
G3	12*	8,03 ^B	2,85	3,08	13,95

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

Nota: Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Tabela 2- Tabela da Análise de Variância do percentual médio de lacunas osteocíticas vazias em tecido ósseo mandibular de ratos corados com HE, nos grupos experimentais e controle. Canoas, 2006.

Causa de Variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrado	F	P
Grupo	2	186,51	6,08	0,005
Erro Experimental	35	536,67		
Total Corrigido	37	723,18		

O núcleo de algumas células do endotélio e de osteócitos dos animais expostos à radiação apresentava uma alteração, que se assemelhava a um vacúolo ou bolha ou a uma região esférica fracamente corada (Figura 5).

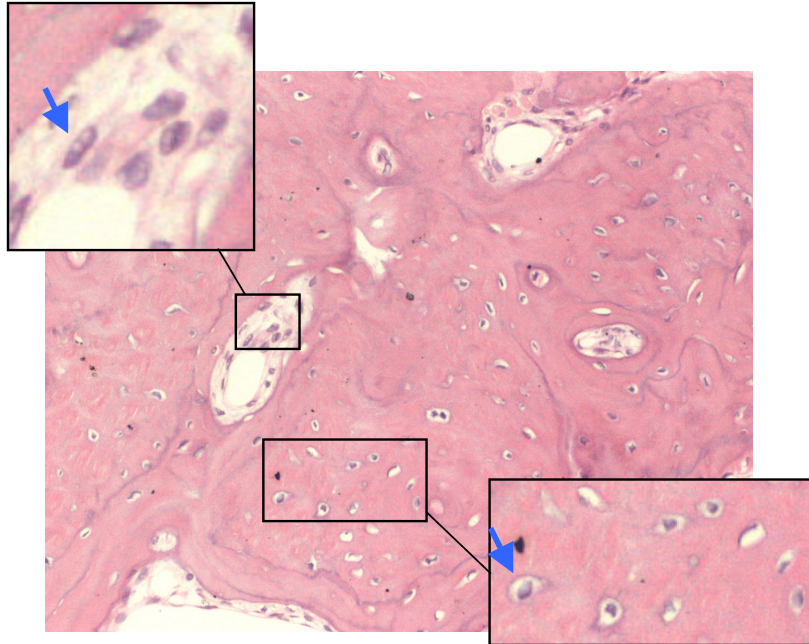


Figura 5 – Fotomicrografia de tecido ósseo mandibular de animal do grupo 1 (G1). As regiões em destaque, nos cantos superior esquerdo e inferior direito, revelam, respectivamente, presença de alteração nuclear no endotélio e osteócitos. HE. Aumento 200X.

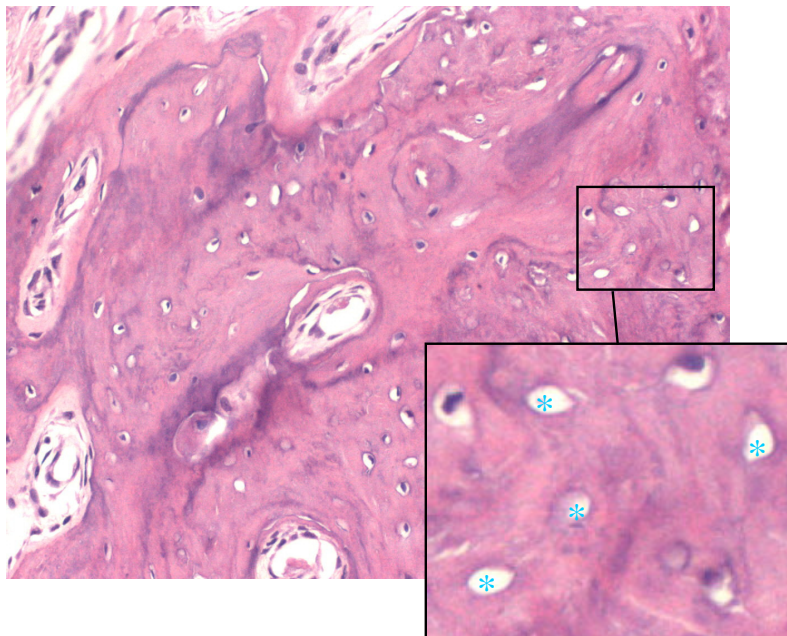


Figura 6 – Fotomicrografia de tecido ósseo mandibular de animal do grupo 2 (G2). A região em destaque revela a presença de lacunas osteocíticas vazias (*). HE. Aumento 200X.

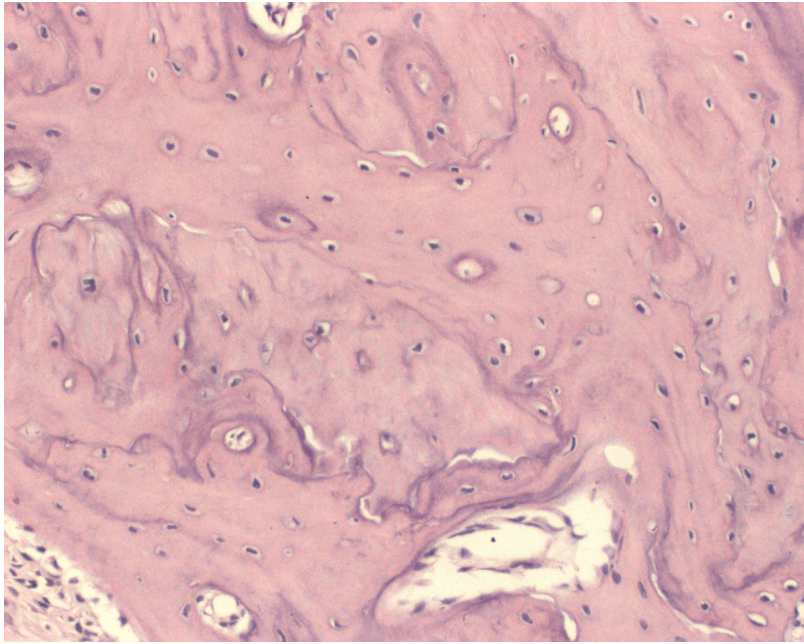


Figura 7 – Fotomicrografia de tecido ósseo mandibular de animal do grupo 3 (não irradiado) (G3). HE. Aumento 200X.

6. DISCUSSÃO

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; BÄCKSTRÖM, 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, sem o uso da anestesia durante as sessões de tratamento (CARL et al. 1990; WÜRSCHMIDT et al., 1992; KLEINEIDAM et al., 1994; CEELLEN et al., 2001). 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 et al. (1977), Zywiets et al. (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 et al. (1954), apesar de empregarem uma dose única de 15 Gy de radiação X em ratos, foram 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 1,0 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.

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; SCIUBBA, 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 et al., 1994), o Co^{60} (ZYWIETZ et al., 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.

O emprego do EDTA, para a descalcificação dos espécimes destinados à avaliação em Microscopia de luz, está alicerçado nos trabalhos de Salomon et al. (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.

A radioterapia, modalidade terapêutica empregada para o tratamento de neoplasias na região de cabeça e pescoço, apesar de apresentar seus efeitos benéficos sob o tecido tumoral, causa danos nos tecidos normais, localizados no portal da radiação. Assim, as glândulas salivares, a mucosa oral, o osso, os dentes, os músculos da mastigação e a articulação temporo-mandibular são afetados pelo emprego das radiações ionizantes. Conseqüentemente, pode-se observar, em pacientes irradiados, hipossalivação, mucosite, disgeusia, osteorradiationecrose, cárie de radiação e trismo (VISSINK et al., 2003).

No entanto, dentre as complicações tardias da radioterapia, a osteorradiationecrose continua sendo um importante e sério problema clínico (ANG et al., 2003; TENG e FUTRAN 2005). Isto porque o osso irradiado apresenta-se hipóxico, hipovascular e hipocelular (MARX, 1983; NEVILLE et al., 1998; STORE e OLSEN, 2005; STORE et al., 2005). Apesar de vários autores comentarem a destruição de osteócitos no tecido ósseo irradiado (BAKER, 1982; SHAFER et al., 1987; REGEZI e SCIUBBA, 2000), poucos estudos (ROHRER et al., 1979) avaliaram, de forma quantitativa, a diminuição destas células no osso.

O osteócito ocupa, na matriz óssea, um compartimento denominado lacuna osteocítica (WHITSON, 2001). Quando esta célula necrosa, a lacuna osteocítica torna-se vazia. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar, microscopicamente, o percentual médio de lacunas osteocíticas vazias, em tecido ósseo mandibular de ratos, expostos a teleterapia fracionada por cobalto-60.

Segundo BAKER (1982), os tecidos com baixa atividade proliferativa, como o tecido ósseo, respondem lentamente à radiação, apresentando alterações tardias ou a longo prazo. STONE et al. (2003) relataram que os efeitos crônicos da radiação podem ser observados meses a anos após o final do esquema terapêutico. Levando em consideração este fato, neste estudo procurou-se avaliar o efeito da teleterapia fracionada em mandíbula de ratos em dois tempos experimentais, sendo o primeiro imediatamente após a conclusão do esquema radioterápico e, o segundo, aos 30 dias subseqüentes, visto ser o metabolismo tecidual do rato mais rápido do que o do homem.

Os resultados desta investigação apontaram que o percentual de lacunas osteocíticas vazias, nos grupos experimentais, independentemente do

tempo de observação, foi estatisticamente superior ao do grupo controle. Isto comprova as afirmações de Meyer et al., 1963; Rohrer et al., 1979; Baker, 1982; Marx, 1983; Shafer et al., 1987; Neville et al., 1998; Regezi e Sciubba, 2000; Store e Olsen, 2005; Store et al., 2005 que relataram uma condição de hipocelularidade no tecido ósseo exposto à radiação.

Neste experimento, a diminuição do número de células no tecido mandibular irradiado expressou-se, tanto imediatamente após a conclusão da teleterapia, quanto aos 30 dias subseqüentes. Era de se esperar, no entanto, que a porcentagem de lacunas osteocíticas vazias seria maior no grupo experimental 2, em relação ao grupo 1, visto ser a osteorradiocrose um efeito tardio da radiação. Outros estudos, empregando observações em mais longos períodos de tempo, fazem-se necessários, para a avaliação de um possível agravamento da condição de hipocelularidade neste tecido.

Com vistas nos resultados desta pesquisa, surge o questionamento do porquê da ocorrência do percentual de lacunas osteocíticas vazias aumentada em tecido irradiado. Talvez, o prejuízo evidenciado no leito vascular terminal, ocasionando dano na microcirculação local e ao estroma de suporte, caracterizado por telangiectasia, oclusão dos capilares sangüíneos (BAKER, 1982; SHAFER et al., 1987; LAMBERT et al., 1997) cause uma diminuição da vascularização (MATHES e ALEXANDER, 1996), ou seja, na chegada de suprimento sangüíneo aos osteócitos, que acabam necrosando. A injúria na microcirculação local poderia ser a responsável, também, pela diminuição da quantidade de oxigênio no tecido ósseo. Ainda, a microcirculação parece ser mais problemática na mandíbula, do que na maxila. Esta última apresenta-se, normalmente, mais vascularizada do que a mandíbula. Por isso, a incidência de osteorradiocrose é maior no tecido mandibular, do que no maxilar (THORN et al., 2000, ANG et al., 2003; REUTHER et al., 2003).

Apesar de não ter sido objetivo deste estudo, pôde-se observar, tanto nos osteócitos, quanto nas células endoteliais presentes no campo de estudo, alterações nucleares caracterizadas pelo surgimento de regiões fracamente coradas, assemelhando-se a bolhas ou vacúolos. Estes resultados reforçam a presença de dano da radiação nos osteócitos e endotélio vascular. Essas mesmas alterações nucleares foram percebidas em fibroblastos pulpares de molares de ratos irradiados por cobalto-60 (VIER-PELISSER, 2005).

A diminuição do número de osteócitos no tecido mandibular irradiado de ratos, caracterizado pelo aumento da percentagem de lacunas osteocíticas vazias, ajudaria a explicar a ocorrência de osteorradionecrose. Shafer et al. (1987) relataram que, em geral, radiação, trauma e infecção são fatores envolvidos na patogênese dessa importante complicação da radioterapia na região de cabeça e pescoço. A literatura recente aponta para um mecanismo de fibroatrofia para o desenvolvimento da osteorradionecrose, em detrimento do tradicional mecanismo da insuficiência vascular (DELANIAN e LEFAIX, 2004; TENG e FUTRAN, 2005). Outra hipótese seria que a radiação induziria osteorradionecrose pela indução de apoptose em células ósseas (SZYMCZYK et al., 2004). Acredita-se que a diminuição do número de osteócitos no tecido ósseo irradiado seja um componente importante na etiologia da osteorradionecrose.

7. CONCLUSÃO

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

- capaz de promover um aumento, estatisticamente significativo ($P=0,005$), no percentual médio de lacunas osteocíticas vazias em tecido ósseo mandibular de rato, percebido tanto imediatamente após a conclusão do esquema radioterápico, quanto aos trinta dias subseqüentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANG, E.; BLACK, C.; IRISH, J.; BROWN, D.H.; GULLANE, P.; O'SULLIVAN, B.; NELIGAN, P.C. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v.56, n.2, p.92-99, Mar. 2003.

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.

BEUMER, 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, 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.

CARL, U.M.; BECK-BORNHOLDT, H.P.; BAUMANN, M.; LORENZEN, J.; VOGLER, H. 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.

CEELEN, W.; EL MALT, M.; CARDON, A.; BERREVOET, F.; DE NEVE, W.; PATTYN, P. 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,V.S; WANG,C.C. Osteoradionecrosis of the Mandible Resulting from External Megavoltage Radiation Therapy. **Radiology**, Illinois, v. 112, n. 3, p. 685-689, Sep. 1974.

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.

DELANIAN, S.; LEFAIX, F.L. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. **Radiother. Oncol.**, Amsterdam, v.73, n.2, p.119-131, Nov. 2004.

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.

DIAS, M.C.G.; MACULEVICIUS, J. Terapia Nutricional Domiciliar no Doente com Câncer de Cabeça e Pescoço. **Nutrição em pauta**, v. 12, n. 67, julho-agosto 2004. Disponível em:

<http://www.nutricaoempauta.com.br/novo/38/entparent.html> Acesso em: 24/08/2004

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.

GEHRIG, J.D. Should Teeth be Removed Prior to Radiation Therapy? **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 13, n. 4, p. 929-938, Oct. 1969.

HELLMAN, S. Principles of Cancer Management: Radiation Therapy. In: DE VITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer. Principles & Practice of Oncology**. 5th.ed. New York: Lippincott-Raven, 1997. Cap. 16. p. 307-332.

HUTTON, M.F.; PATTERSON, S.S.; MITCHELL, D.F.; CHALIAN, V.A.; HORNBACK, N.B. The effect of cobalt-60 radiation on the dental pulps of monkeys. **Oral Surg. Oral Méd. 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.

JERECZEK-FOSSA, B.A.; ORECCHIA, R. Radiotherapy induced mandibular bone complications. **Cancer Treat. Rev.**, v.28, n.1, p.65-74, Feb. 2002.

JORDÃO, B.Q.; ANDRADE, C.G.T.J. Ciclo Celular e Meiose. In: JUNQUEIRA e CARNEIRO. **Biologia Celular e Molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2000. cap. 9. p. 171-197.

JUNQUEIRA,L.C.; CARNEIRO,J. Tecido Ósseo. In: _____. **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,1999. cap. 8. p. 111-128.

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.

LAMBERT, P.M.; INTRIERE,N.; EICHSTAEDT,R. Clinical Controversies in Oral and Maxillofacial Surgery: Part One: Management of Dental Extractions in Irradiated Jaws: a Protocol With Hyperbaric Oxygen Therapy. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 55, n. 3, p. 268-274, Mar. 1997.

LANGLAND, O.E.; LANGLAIS, R.P. Biologia das radiações. In: _____. **Princípios do Diagnóstico por Imagem em Odontologia**. São Paulo: Santos, 2002. cap. 12. p. 291-309.

LIMA, A.A.S.; FIGUEIREDO, M.A.Z.; LOUREIRO, M.S.; DUARTE, R. 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.

MARX, R.E. Osteoradionecrosis: A New Concept of its Pathophysiology. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 41, n. 5, p. 283-288, May 1983.

MARX, R.E.; JOHNSON, R.P. Studies in the Radiobiology of Osteoradionecrosis and their Clinical Significance. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 64, n. 4, p. 379-390, Oct. 1987.

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.

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, Sep. 1963.

NATHANSON, A.; BÄCKSTRÖM, A. Effects of ⁶⁰Co-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.

NEVILLE, BW.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Doenças da polpa e do periápice. In: _____. **Patologia Oral & Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 3. p. 93-118.

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

RANKOW, R.M.;WEISSMAN, B. Osteoradionecrosis of the Mandibule. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, St. Louis, v. 80, n. 4, p. 603-611, Aug. 1971.

REGEZI, J.A; SCIUBBA, J.J. Lesões inflamatórias dos maxilares. In: _____. **Patologia bucal. Correlações clinicopatológicas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 13. p. 342-355.

REUTHER, T.; SCHUSTER, T.; MENDE, U.; KÜBLER, A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients – a report of a thirty years retrospective review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.32, n.3, p.289-295, Jun. 2003.

ROHRER, M.D.; KIM, Y.; FAYOS, J.V. ARBOR, A. 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.; WENZEL, S.; JENICKE, L.; BOHUSLAVIZKI, K.H.; KEHRL, W.; ZYWIETZ, F; ROESER, K. 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.; TESCHE, S.; ZYWIETZ, F.; WENZEL, S.; METTERNICH, F.U. 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 interodontoblastic fibres in the rat molar. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 171-176, 1991.

SATO, O.; TAKEUCHI-MAENO, H.; MAEDA, T.; TAKANO, Y. 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. **A Folha Méd.**, Rio de Janeiro, v. 119, n. 4, p. 9-27, out.-dez. 2000.

SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. Lesões físicas e químicas da cavidade bucal. In: _____. **Tratado de patologia bucal**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. cap. 10. p.486-548.

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. cap. 45. p. 475-488.

SILVERMAN, 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, Dec-Nov. 1965.

SYKES, L.M. Na ínterim extraoral prosthesis used for the rehabilitation of a patient for osteoradionecrosis of the mandible: a clinical report. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.86, n.2, p.130-134, Aug. 2001.

SOARES, H.A.; MARLCUCCI, G. Osteoradionecrose: Avaliação dos Fatores de Risco. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 9-14, jan-mar. 1996.

STONE, H.B.; COLEMAN, C.N.; ANSCHER, M.S.; McBRIDE, W.H. Effects of Radiation on Normal Tissue: Consequences and Mechanisms. **Oncology**, Basel, v. 4, n. 9, p. 529-536, Sep. 2003.

STORE, G.; OLSEN, I. Scanning and transmission electron microscopy demonstrates bacteria in osteoradionecrosis. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.34, n.7.; p.777-781, Oct. 2005.

STORE, G.; ERIBE, E.R.; OLSEN, I. DNA-DNA hybridization demonstrates multiple bacteria in osteoradionecrosis. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.34, n.2, p.193-196, Mar. 2005.

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.

SZYMCZYK, K.H.; SHAPIRO, I.M.; ADAMS, C.S. Ionizing radiation sensitizes bone cells to apoptosis. **Bone**, Elmsford, v.34, n.1, p.148-156, Jan. 2004.

TAKEKAWA, M.; MATSUDA, M.; OHOTUBO, S. Effect of Irradiation on Autogenous Bone Transplantation in Rat Parietal Bone. **Histol. Histopathol.**, Murcia, v. 15, n. 1, p. 7-19, Jan. 2000.

TENG, M.S.; FUTRAN, N.D. Osteoradionecrosis of the mandible. **Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Philadelphia, v.13, n.4, p.217-221, Aug. 2005.

THORN, J.J.; HANSEN, H.S.; SPECHT, L.; BASTHOLT, L. Osteoradionecrosis of the Jaws: Clinical Characteristics and Relation to the Field of Irradiation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 58, n. 10, p. 1088-1093, Oct. 2000.

VIER-PELISSER, F.V. **Efeito da teleterapia fracionada em polpa dentária de ratos – Análise em microscopia óptica e eletrônica de transmissão.** Porto Alegre, 2005. 131f. Tese (Doutorado em Estomatologia Clínica) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

VISSINK, A.; JANSMA, J.; SPIJKERVET, F.K.; BULLAGE, F.R.; COPPES, R.P. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v.14, n.3, p.199-212, Mar-Apr, 2003.

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.

WANG, C.C. **Radioterapia: Princípios, Indicações e Resultados.** Centro de Oncologia Radioterápica do Rio Grande do Sul. 1978.

WHITSON, S.W. Osso. In: TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função.** 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. cap. 7. p. 101-122.

WÜRSCHMIDT, F.; BECKER, S.; MAURER, T.; OMNICZYNSKI, M.; SCHELP, R.; VOGLER, H.; BECK-BORNHOLDT, H.P. 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.

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.

ANEXOS

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

Anexo B



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS E ANIMAIS

TERMO DE AVALIAÇÃO

CEP-ULBRA 2005-005 A											
Título: EFEITO DA RADIOTERAPIA FRACIONADA NO OSSO MANDIBULAR DE RATO – ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA											
Autor e Pesq. Resp: Audrei Pelisser											
Prof. Orient.: Vânia Regina Camargo Fontanella											
Tipo de projeto: <table border="1"><tr><td>Pesquisa</td><td>TCC</td><td>x</td><td>Dissertação</td><td>Tese</td></tr></table>							Pesquisa	TCC	x	Dissertação	Tese
Pesquisa	TCC	x	Dissertação	Tese							
Dir. Pesq.: NSA											
Curso: Programa de Pós-Graduação em Odontologia											
Ingresso: 18/03/2005											
Instituição onde será realizada: ULBRA Canoas/RS e PUC/RS											
Patrocinador: Pesquisador responsável											
Data da avaliação: reunião ordinária de 07/04/2005											

O projeto de pesquisa, acima identificado, foi avaliado e APROVADO como eticamente adequado e de acordo com as Leis 6.638/79 e 9605/98, com o Decreto 24.645/34, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA), com os Princípios para Pesquisa envolvendo Animais (Genebra, 1985) e outras instruções que tratam da matéria, pelo plenário do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da ULBRA.

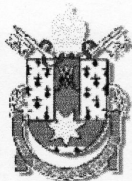
O pesquisador responsável deverá apresentar relatórios anuais a este CEP, informando os resultados parciais do projeto, bem como comunicar a data de conclusão da pesquisa.

Canoas, 15 de abril de 2005.


DR. JOSÉ SCHNEIDER SANTOS
Coordenador do CEP-ULBRA

Rua Farroupilha, 8001 - Bairro São Luís - Canoas/RS - CEP 92.450-900 - Sala 224 - Prédio 14
Fone (051xx) 477-9217- E-mail: comitedeetica@ulbra.br - Home Page: www.ulbra.br/pesquisa

Anexo C



Porto Alegre, 21 de novembro de 2004.

À

Comissão Científica e de Ética da ULBRA

Prezados Senhores:

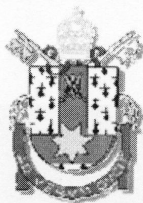
Eu, Dra. Liliane Soares Yurgel, chefe do Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucomaxilofacial do Hospital São Lucas da PUCRS, conheço o protocolo de pesquisa "**Efeito da radioterapia em polpa coronária de dentes de ratos - análise em microscopia óptica e eletrônica de transmissão**" desenvolvido pela pesquisadora Fabiana Vieira Vier Pelisser, bem como a metodologia de pesquisa utilizada e autorizo o pesquisador Audrei Pelisser a compartilhar da fase experimental deste projeto, visando a sua utilização no desenvolvimento da pesquisa intitulada "**Efeito da radioterapia no tecido ósseo de mandíbulas de ratos - análise em microscopia óptica**", que será apresentado ao programa de Pós-Graduação em Odontologia do Curso de Odontologia da Universidade Luterana do Brasil como requisito para realização da Dissertação na área de CTBMF.

Atenciosamente,

Dra. Liliane Soares Yurgel

Chefe do Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucomaxilofacial do Hospital
São Lucas da PUCRS

Anexo D



Porto Alegre, 21 de novembro de 2004

À
Comissão Científica e de Ética da ULBRA

Prezados Senhores:

Eu, Dra. Maria Antônia Zancanaro de Figueiredo, orientadora da aluna Fabiana Vieira Vier Pelisser, conheço o protocolo de pesquisa "**Efeito da radioterapia em polpa coronária de dentes de ratos - análise em microscopia óptica e eletrônica de transmissão**" desenvolvido pela pesquisadora, bem como a metodologia de pesquisa que será utilizada e autorizo o pesquisador Audrei Pelisser a compartilhar da fase experimental deste projeto, visando a sua utilização no desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "**Efeito da radioterapia no tecido ósseo de mandíbulas de ratos - análise em microscopia óptica**", que será apresentado ao programa de Pós-Graduação em Odontologia do Curso de Odontologia da Universidade Luterana do Brasil como requisito para realização da Dissertação na área de CTBMF.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, reading "Maria Antônia Z. de Figueiredo".

Dra. Maria Antônia Zancanaro de Figueiredo

Orientadora

Professora do Programa de Doutorado em Estomatologia Clínica/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](#)