

Carolina Cintra Gomes
Cirurgiã-Dentista

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR
DA VITAMINA “E”
EM GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS :
Uma análise morfométrica**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Solange Maria de Almeida

Piracicaba
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8^a. / 6159

G585a	<p>Gomes, Carolina Cintra. Avaliação do efeito radioprotetor da vitamina “E” em glândulas parótidas de ratos: uma análise morfométrica. / Carolina Cintra Gomes. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Solange Maria de Almeida. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Radiação ionizante. I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Evaluation of radioprotective effect of vitamin E in parotid gland of rats: a morphometric analysis

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Ionizing radiation

Área de Concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Mestre em Radiologia Odontológica

Banca Examinadora: Solange Maria de Almeida, Rívea Inês Ferreira, Frab Norberto Bóscolo

Data da Defesa: 20-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Radiologia Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata CAROLINA CINTRA GOMES aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Solange Maria de Almeida".

PROFa. DRa. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rivea Inês Ferreira".

PROFa. DRa. RIVEA INÊS FERREIRA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Frab Norberto Boscolo".

PROF. DR. FRAB NORBERTO BOSCOLO

Dedico esse trabalho a Deus, razão de tudo, e aos meus pais, Aristóteles e Madalena, que me ensinaram a viver com dignidade e que se deram por inteiro, renunciando seus sonhos para realizar os meus.

Agradecimentos aos Professores

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, por ter oferecido a oportunidade de conhecer e conviver com profissionais renomados em suas áreas.

À minha querida Orientadora Prof^a. Dra. Solange Maria de Almeida, que sempre foi muito mais que uma professora, é uma amiga, mãe e conselheira que me mostrou a importância da mudança e a necessidade de recomeçar. Hoje cheguei aqui através do seu incentivo e confiança em mim. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, meu orientador durante quase todo o curso, agradeço por tudo o que me ensinou e me proporcionou a aprender. Mesmo com tantos afazeres sempre estive à disposição para tirar dúvidas, conversar sobre os trabalhos e me orientar de forma exemplar. Foi uma honra ter sido sua orientada!

Ao Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo, que me fez muitas vezes voar em sua sabedoria, e me mostrou o valor do aprender com sua experiência. Sou uma pessoa privilegiada por ter um professor tão competente ao meu lado! Obrigada pelo carinho e atenção!

À Prof^a. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pela sua dedicação e competência para realizar as análises estatísticas. Obrigada por estar à nossa disposição mesmo sempre muito ocupada!

À Prof^a Dra. Rívea Inês Ferreira, pela atenção e carinho dispensados!

Ao Prof. Dr. Flávio Ricardo Manzi pelos ensinamentos e incentivo para seguir a carreira acadêmica. Muito obrigada!

Agradecimentos Especiais

Meu Deus, obrigada pelo seu amor, pela sua presença constante em todos os momentos dessa caminhada. Obrigada por me mostrar o melhor caminho a seguir, por nunca me deixar desistir, por estar sempre pronto para me ouvir! Sem o seu amor Senhor nada seria possível!

À Nossa Senhora e Santo Expedito, a quem recorri nas horas mais difíceis, obrigada pelo fortalecimento na fé, no amor e pela esperança de dias sempre melhores!

Pai, Mãe, obrigada pela dedicação, carinho, renúncia, esforço e incentivo durante toda a minha vida e principalmente nesses dois anos que passei aqui! A saudade muitas vezes apertou, mas fossem quais fossem os obstáculos vocês sempre me incentivaram a prosseguir, e lutaram comigo... Sou o que sou à custa dos seus sacrifícios! Amo muito vocês!

Cristiana e Camila, irmãzinhas do meu coração, obrigada por acreditarem em mim! Obrigada também por me acharem “inteligente”, sei que não é bem assim, mas isso sempre serviu como incentivo!!! Amo vocês!

Vó Therezinha, obrigada pelo imenso amor e carinho que tem por mim! Obrigada pela saudade que também sinto por ti! Obrigada por ser minha “caixinha de segredos” para quem posso confiar todas as minhas alegrias e angústias, mesmo de longe... Desculpe-me por não estar ao seu lado como deveria e gostaria! Te amo Vó!!!

Lucas obrigada por correr de braços abertos em minha direção todas as vezes que chego à Goiânia! Laís, minha princesinha, obrigada por ter me feito ser tia pela segunda vez em Piracicaba! Vocês queridos sobrinhos, são bênçãos de Deus que transformaram a minha vida!

Sueli, minha segunda mãe, minha amiga, confidente, pessoa que admiro e me orgulho, obrigada pelo amor e dedicação, pela eterna preocupação, pelo incentivo e confiança! Didi, sem você tudo seria bem mais difícil!

Menê, obrigada por me ajudar em todos os momentos que preciso! Com certeza você não é só meu cunhado, mas um amigo que sempre posso contar!

Sabrina, Mariana e Denise, amigas de Goiânia, obrigada pela amizade e carinho! Amigas vocês são como irmãs que escolhi para permanecerem para sempre em minha vida!

A todos os parentes e amigos que estiveram sempre disponíveis quando meu tempo era tão limitado... que se acostumaram com os meus “Parabéns” atrasados, que aceitaram tantos “não vou poder ir”...Obrigada pela compreensão e carinho!

Às tias e amigas do terço, obrigada pelas orações, por estarem sempre ao lado de minha mãe quando fui fonte de suas preocupações. Obrigada por tudo!!!

À minha amiga –irmã Luciana, obrigada por estar comigo em todos os momentos em Piracicaba! O nosso “casamento” continua agora no doutorado!!!

À minha amiga Thaisângela por ter me acolhido em Piracicaba. Sua hospitalidade e amizade foram fundamentais para que eu pudesse enfrentar essa jornada! Serei eternamente grata por tudo o que você me fez!!!

À Flávia Maria, que se mostrou mais que uma amiga, um verdadeiro anjo da guarda no momento em que mais precisei! Sem a sua ajuda esse trabalho não seria possível! Nunca esquecerei o que fez por mim! Só posso dizer: Obrigada!

Aos meus colegas Daniela Brait, Ésio, Matheus, Luciana, Adriana, Alynne, Andréa, Daniela Pita, Danielle, Ellen, Flávia, Letícia, Luís, Márcia e Maria valeram as discórdias, as críticas, os abraços e as vezes que tivemos que nos afrontar. Foi concreto o apego por uns, as reservas em relação a outros e amor por muitos de vocês! Tudo só não foi real para quem não conseguiu crescer. Àqueles que deixarão Piracicaba, fica a saudade e o desejo de um reencontro. Àqueles que ficam, que nossa amizade se fortaleça! Obrigada!

*À **Ângela**, minha amiga e mãe em Piracicaba, obrigada por me adotar como filha, pela amizade com toda a minha família, pelos finais de semana em sua casa, pelas conversas nas quintas-feiras... Angel, Lia e Maria Amélia adoro vocês!*

*Às minhas amigas, **Giu, Luciana, Lucinha e Marina** pela amizade que fazem de Piracicaba um lugar muito mais feliz e divertido!!!!*

*Ao **Marcus**, pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis que passei em Piracicaba. Sua alegria, preocupação, incentivo e admiração fizeram os problemas parecerem menores e meus dias em Piracicaba muito melhores! Adorei te conhecer!*

*Aos meus amigos **Fernando e Waldeck**, meu respeito e gratidão por tudo o que fizeram por mim! Vocês são exemplos de dedicação e seriedade com a profissão! Se hoje sou apaixonada pela Clínica, devo isso a vocês!*

*À **Roberta**, pessoa que se tornou amiga e que tanto me ajudou, me ouviu e me aconselhou. Ah não consigo imaginar como teria sido sem você! Obrigada!*

*À **Giselda**, à **Lú**, à **Leny**, à **Cidinha** e aos demais funcionários da FOP, obrigada pelo bom dia, pela organização da Clínica, pela limpeza da faculdade, pelos certificados, pela organização da biblioteca... Através de vocês os sonhos se tornam possíveis!*

*Aos **pacientes** que me respeitaram quando pouco poderia fazer e na humildade me confiaram segredos e sofrimentos e, enfim, me ensinaram a paciência, o respeito, a humildade para que hoje pudesse ser uma profissional melhor. Muito obrigada!*

*"Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo
e nunca se arrepende."
(Leonardo da Vinci)*

RESUMO

O objetivo neste trabalho foi avaliar, por meio de análise morfométrica, o efeito radioprotetor da vitamina E em glândulas parótidas de ratos. Foram utilizados 90 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), os quais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: Óleo, correspondendo aos animais que receberam óleo de oliva; Óleo Irradiado, grupo no qual os animais receberam óleo de oliva e foram irradiados com dose única de 15 Gy de radiação gama na região de cabeça e pescoço; Irradiado, em que os animais foram irradiados com dose única de 15 Gy de radiação gama; Vitamina E, grupo em que os animais receberam solução de acetato de alfa-tocoferol (vitamina E), mas não foram irradiados e Vitamina E Irradiado, no qual os animais receberam a solução de acetato de alfa-tocoferol (vitamina E) antes de serem irradiados com dose única de 15 Gy de radiação gama na mesma região. Oito horas e trinta dias após a irradiação, os animais foram anestesiados e as glândulas parótidas dos lados direito e esquerdo foram removidas cirurgicamente. Após a excisão cirúrgica, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico. As peças foram preparadas, incluídas em historesina e cortes semi-seriados foram obtidos de acordo com o protocolo estabelecido pela disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. A partir de cada bloco foram obtidas três lâminas histológicas, contendo quatro cortes alternados, com intervalo de 30 cortes entre eles. Os cortes foram montados em lâminas, corados com hematoxilina e eosina, sendo posteriormente utilizados para avaliação morfométrica. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey. A análise morfométrica dos ácinos no tempo de 8 horas mostrou diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos Óleo Irradiado e Vitamina E Irradiado. No tempo de 30 dias, o grupo Vitamina E Irradiado e o grupo Irradiado, apresentaram redução significativa na quantidade de ácinos em relação ao grupo Óleo. Quando os grupos foram avaliados em função do tempo, observou-se redução significativa nos grupos Óleo Irradiado e Irradiado aos 30 dias. As análises morfométricas dos ductos intercalares e estriados não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos em ambos os tempos estudados. Dentro das condições experimentais utilizadas, conclui-se que a vitamina E demonstrou leve ação radioprotetora em glândulas parótidas irradiadas.

Palavras-chave: Radiação ionizante, ácinos, ductos intercalares, ductos estriados.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, by morphometric analysis, the radioprotective effect of vitamin E in parotid glands of rats. For this purpose, ninety male rats (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) were used, which were randomly divided into five experimental groups: Oil, corresponding to the animals that received olive oil; Irradiate Oil, a group in which the animals received olive oil and were irradiated with a single dose of 15 Gy of gamma radiation in the head and neck region; Irradiate, in which the animals were irradiated with 15 Gy single dose of gamma radiation; Vitamin E, a group in which the animals received solution of alpha-tocopherol acetate (vitamin E) but were not irradiated and Vitamin E irradiated, in which the animals received the solution of alpha-tocopherol acetate (vitamin E) before being irradiated with 15 Gy single dose of gamma radiation in the same region. Eight hours and thirty days after irradiation, the animals were anesthetized and the parotid glands of right and left sides were removed surgically. After surgical excision, the animals were sacrificed by anesthetic depth. The specimens were prepared, including in historesin and semi-series cuts were obtained in accordance with the protocol established by the discipline of Histology, Faculty of Dentistry of Piracicaba - UNICAMP. From each block were obtained three histologic slides, alternating with four cuts, with an interval of 30 cuts between them. The sections were mounted on slides, colored with hematoxylin and eosin, and then used for morphometric assessment. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. Morphometric analysis of acinus in time of 8 hours showed statistically significant difference between the groups Vitamin E Irradiate and Oil Irradiate. At time of 30 days, the vitamin E Irradiate group and the Irradiate group, showed significant reduction in the amount of acinus compared to the Oil group. When the groups were evaluated in terms of time, there was significant reduction in the groups Oil Irradiate and Irradiate to 30 days. The morphometric analysis of interim and striated ducts showed no statistically significant differences between groups in both periods studied. Within the experimental conditions used, it is concluded that vitamin E showed mild radioprotective action in parotid glands of rats irradiated.

Key words: Ionizing radiation, acinus, ducts interim, striated ducts.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. PROPOSIÇÃO	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	42

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço é considerado um dos principais tipos de neoplasias malignas que ocorrem no Brasil e no mundo, em função de sua significativa incidência, prevalência e mortalidade. Estima-se que, em 2008 ocorreram 11 casos de câncer de boca/100.000 habitantes no Brasil, totalizando 14.160 novos casos nesse ano. A incidência anual de câncer de boca está em torno de 275.000 novos casos por ano (Instituto Nacional do Câncer INCA/2008). Além da significativa incidência, mortalidade e custo econômico, o câncer de cabeça e pescoço origina impactos negativos, e muitas vezes devastadores, na qualidade de vida dos pacientes. Tratamentos mutiladores podem se associar a disfonia, disfagia e desfigurações faciais relevantes, com perda funcional e repercussão no relacionamento social.

A radioterapia combinada com a cirurgia tem sido a principal modalidade de tratamento para neoplasias de cabeça e pescoço. Esse tratamento combinado tem alcançado altos índices de cura e aumento da sobrevivência dos indivíduos acometidos. Além dos efeitos anti-tumorais, a radiação ionizante causa danos em tecidos normais, localizados na área irradiada. Por ser esta uma área complexa, composta por diversas estruturas desiguais que respondem de formas diferentes às radiações, isso se torna muito evidente. Os efeitos colaterais da radioterapia não poupam os pacientes de conseqüências devastadoras. Entretanto, atualmente já existe a radioterapia com intensidade modulada (IMRT - Intensity Modulated Radiotherapy) que têm a capacidade de controlar melhor o feixe de radiação do que a radioterapia convencional, provocando assim o mínimo de danos às células normais. Nos casos de câncer de cabeça e pescoço o tratamento pode ser idealizado para aplicar uma dose menor de radiação sobre as glândulas salivares, do que a aplicada pelos tratamentos convencionais. Dessa forma, as glândulas salivares são “poupadas” dos efeitos da radiação havendo maior chance de manter a função glandular.

O principal e mais devastador efeito colateral deste tratamento é a indução de danos às glândulas salivares maiores. A hipofunção dessas glândulas acarreta efeitos secundários como o comprometimento do paladar, mastigação e fala. Além disso, a redução do volume salivar leva à maior susceptibilidade de lesões na cavidade bucal como cárie e candidíase. Isso ocorre devido à flora bacteriana se modificar, tornando-se mais patogênica, deixando a mucosa ulcerada, ressecada e dolorida, afetando também o uso de próteses dentárias e diminuindo a qualidade de vida do indivíduo.

A preocupação em manter uma melhor qualidade de vida do paciente durante e após o tratamento radioterápico e prevenir seqüelas que este possa vir a causar é grande por parte das equipes médica e odontológica.

As alterações radioinduzidas na região de cabeça e pescoço podem ser divididas em precoce, afetando mucosa e glândula salivar, causando perda do paladar; intermediária, afetando glândula salivar e causando perda do paladar; e tardia, atingindo glândulas salivares, dentição, periodonto, músculos e articulações. Nesse contexto, observa-se que as glândulas salivares são afetadas em todos os momentos do tratamento radioterápico.

A glândula parótida é uma glândula salivar maior, sendo a maior glândula salivar entre as glândulas pares. Esta glândula é dividida em lóbulos por septos de tecido conjuntivo ricos em fibras colágenas. O tecido conjuntivo (estroma) contém linfócitos e plasmócitos, os quais sintetizam imunoglobulinas do tipo A (IgA) que contribuem para a defesa da cavidade bucal contra microorganismos patogênicos. O parênquima é composto pela unidade morfofuncional da glândula, o adenômero, sendo este constituído por ácinos (compostos por células piramidais), ductos intercalados (representando a continuação da luz dos ácinos), ductos estriados e ductos excretores.

As glândulas salivares têm como função a produção salivar. Esta possui várias substâncias orgânicas e inorgânicas, proporciona a proteção natural dos

dentos e tecidos moles da cavidade bucal, além de auxiliar na mastigação, deglutição e digestão do alimento.

Quando as glândulas salivares são expostas à radiação ionizante, o funcionamento dessas é rapidamente afetado. Em humanos, com uma semana de radioterapia convencional fracionada para a região de cabeça e pescoço (dose acumulativa de aproximadamente 10 Gy) os pacientes se queixam de sensação de boca seca e a secreção de saliva pela glândula salivar maior pode apresentar um declínio de 50%. As reduções máximas na função dessas glândulas são frequentemente encontradas entre duas e três semanas do tratamento (Dreizen *et al.*, 1977; Westcott *et al.*, 1978).

Em casos de radioterapia realizada sem tratamento prévio, várias células epiteliais serosas dos ductos intralobulares das glândulas salivares apresentam evidências morfológicas de danos irreversíveis causados pela irradiação, ao contrário de células mucosas vizinhas e outras que não foram atingidas. Estes efeitos tão rápidos são inesperados, pois as glândulas salivares são compostas de células que se replicam lentamente, e sendo assim, não seriam esperadas alterações funcionais precoces.

Os efeitos da radiação ionizante são mediados principalmente pelos radicais livres de oxigênio que são gerados pela ação da radiação sobre as moléculas de água presente nos tecidos. Estes radicais altamente oxidantes removem átomos de hidrogênio de ácidos graxos, causando a peroxidação lipídica com conseqüentes alterações na permeabilidade e fluidez das membranas, e em última instância, com a morte das células. Os oxiradicais também induzem quebra na fita de DNA e oxidação protéica.

Algumas substâncias, como vitaminas A, C e E, podem diminuir a ação dos radicais livres formados após a irradiação, sendo denominadas de substâncias radioprotetoras. A vitamina E é um componente natural de membranas de células de mamíferos e é considerada a principal linha de defesa contra a peroxidação lipídica da membrana (Oski, 1980; Jacobson, 1987).

Dessa forma, vem sendo desenvolvidas pesquisas envolvendo os efeitos biológicos da radiação ionizante e a ação de anti-oxidantes, tanto em organismos vivos como *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A radiação ionizante e as glândulas salivares

2.1.1 Efeito da radiação ionizante nas glândulas salivares

O padrão de radioterapia desenvolvido para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço inclui doses fracionadas de 10 Gy por semana, sendo 2 Gy diariamente por cinco dias consecutivos, durante 5 a 7 semanas totalizando 50 a 70 Gy de exposição. Quando glândulas parótidas são expostas a doses maiores que 60 Gy, ocorrem danos permanentes sem recuperação da hipofunção da glândula salivar, segundo Dobbs *et al.* (1999).

Em um estudo clínico prospectivo realizado por Chao *et al.* (2001), sobre a perda de função salivar em pacientes que receberam radioterapia tridimensional ou de intensidade modulada, a função salivar foi avaliada uma semana antes do início da radioterapia e seis meses após o término do tratamento radioterápico. A dose de irradiação recebida pela glândula parótida foi menor nos pacientes que receberam radioterapia de intensidade modulada. Foi observada uma correlação entre a dose média e a redução da função salivar seis meses após a conclusão da radioterapia. O fluxo salivar apresentou uma redução exponencial, para cada glândula independentemente, numa razão aproximada de 4% por Gy de dose média na parótida.

Sagowski *et al.* (2003) realizaram um estudo com o objetivo de correlacionar danos estruturais histomorfológicos e achados sialoscintigráficos durante a radioterapia fracionada. A área de cabeça e pescoço em ratos foi irradiada com Co^{60} com uma dose total de 60Gy, aplicados em 30 frações de 2 Gy cada durante 6 semanas. No decorrer do tratamento as glândulas parótidas foram examinadas histopatologicamente. Em um estudo paralelo com sete ratos realizou-se a sialoscintigrafia com a aplicação de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetato com a maior acurácia possível. Glândulas salivares de ratos desenvolveram radiosialodenite

dose-dependente. Após uma dose de 16 Gy edema intra e extracelular se desenvolveu em glândulas salivares. Vacuolização progressiva (30 Gy) foi desenvolvida em lipomatose (46 Gy) e alterações necróticas (60 Gy) nas glândulas parótidas. Seis meses após a irradiação, os danos crônicos histomorfológicos correspondiam à fase II, de acordo com Seifert. Uma correspondente perda em função da glândula foi investigada através da medição de ^{99m}Tc -pertechnetato captado das glândulas salivares sendo 13% (16 Gy), 26% (30 Gy), 57% (46 Gy), 75% (60 Gy) e 66,5% (6 meses pós-irradiação). Esse modelo em animais é adequado para demonstrar a correlação histomorfológica e os achados sialoscintigráficos.

Com objetivo de contribuir para a compreensão da enigmática radiosensibilidade das glândulas salivares, especialmente no que diz respeito aos mecanismos de ação das radiações quanto ao dano precoce dessas estruturas, Konings *et al.* (2005) realizaram análises da literatura a fim de fornecer informações sobre as possibilidades de melhoria desses danos causados por radioterapia em região de cabeça e pescoço. Do ponto de vista clássico, as glândulas salivares não deveriam responder rapidamente à radiação como parece ocorrer. Após a sugestão de apoptose maciça, a ruptura de grânulos e subsequente lise de células acinares foram sugeridas para ser responsável pela hipofunção de glândulas acinares induzida por radiação. O principal problema com estas hipóteses é que testes realizados recentemente mostraram não ocorrer perda celular nos primeiros dias após a irradiação, enquanto fluxo de saliva é drasticamente diminuído. A secreção da água é seletivamente prejudicada durante os primeiros dias depois da irradiação em dose única. A literatura mostra que as células comprometidas sofrem danos especificamente na membrana plasmática, afetando primariamente a secreção aquosa. Embora a composição celular da glândula submandibular e da glândula parótida seja diferente, a resposta aos danos é muito parecida. A hipofunção das glândulas salivares pode ser melhorada pelo tratamento profilático com receptores agonistas específicos. O mais provável mecanismo de ação que explica a enigmática radiosensibilidade precoce para

efeitos da radiação é seletivo para o dano à membrana plasmática de células secretoras, perturbando receptores muscarínicos e estimulando a secreção aquosa. Mais tarde o dano se deve principalmente à clássica morte das células progenitoras mitóticas, levando a uma dificuldade de substituir a capacidade da glândula de células secretoras, mas também é causado por danos ao meio extracelular, impedindo o bom funcionamento celular.

2.1.2 Radiossensibilidade das glândulas salivares

Abok *et al.* (1984) analisando a radiosensibilidade das células de glândulas submandibulares, utilizaram noradrenalina, fenilefrina (agonistas alfa-adrenérgicos) e atropina (antagonista colinérgico) como pré-tratamento para a radioterapia (50 Gy de radiação em dose única). Verificaram que o efeito máximo foi de 96 horas após a irradiação, em que células serosas provenientes de animais irradiados após tratamento prévio com atropina mostraram muito mais lesões generalizadas do que as dos animais expostos somente à radiação X. Em contraste, células serosas sofreram consideravelmente menos danos quando os seus grânulos secretores tinham liberado seu conteúdo uma ou 2 horas antes da irradiação com noradrenalina ou fenilefrina. Outras células epiteliais não mostraram nenhuma modulação da sua pouca radiosensibilidade por estas drogas. As observações foram comprovadas pela morfometria dos três tipos de células: (a) Células mucosas; (b) células serosas não-granuladas e células intralobulares dos ductos estriados; e (c) células serosas granuladas. As conclusões sugerem que a radiosensibilidade das células epiteliais serosas da glândula submandibular está ligada aos grânulos secretores. Estes grânulos são ricos em metais pesados (Zn, Fe e Mn), como ficou demonstrado citoquimicamente com o método de sulfeto de prata. Assim, é concebível que membranas, que englobam organelas ricas em metais com a capacidade de formar sistema redox (por exemplo, Fe²⁺ em equilíbrio Fe³⁺) revelam maior

sensibilidade aos danos à radiação, devido à indução provocada pela catalisação de metais na peroxidação lipídica pela radiação ionizante.

Em experimentos com primatas não humanos, Stephens *et al.* (1989) obtiveram culturas de tecidos de glândulas parótidas em meio enriquecido com soro homólogo e suplementadas com níveis baixos de isoproterenol, que foram irradiadas com doses únicas de 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 ou 15,0 Gy. Microscopicamente, a morte das células acinares serosas foi vista em áreas inalteradas por autólise. Baseado no número de aberrações nucleares, a resposta à dose não diferiu significativamente do que a observada 24 horas após a glândula parótida ter sido irradiada *in vivo*. A rápida resposta semelhante sob duas condições mostra que o comprometimento funcional agudo foi causado diretamente pela apoptose de células acinares ao invés de ser o resultado de processos inflamatórios e circulatórios comprometidos devido às injúrias vasculares.

Peter *et al.* (1995) realizaram um estudo com o objetivo de investigar a possível posição dos grânulos secretores na disfunção de glândulas salivares induzida por radiação. Ratos receberam tratamento prévio de isoproterenol (5mg/Kg via intraperitoneal) para degranulação de ácinos da glândula salivar. No esvaziamento máximo, as glândulas foram localmente irradiadas com uma dose única de 15 Gy de radiação X. Dados de estudos prévios combinados aos dados do presente estudo sugerem que a melhora na função da glândula parótida é atribuída predominantemente a um estímulo na proliferação de células acinares pelo isoproterenol, e não no efeito de degranulação. Após o tratamento prévio com isoproterenol, uma expressão precoce de danos nas células acinares induzidos por radiação precedendo a morte foi observada, seguida por uma rápida regeneração tecidual. Assim, o estímulo proliferativo nas células acinares pode desmascarar o dano letal latente, resultando na reposição precoce de células mortas por células novas e intactas funcionalmente.

Coopes *et al.* (1997) revisaram o conceito da degranulação dos ácinos avaliando a função das glândulas salivares após 1, 3, 6, 10 e 30 dias pós-irradiação. Os animais foram tratados previamente com drogas sialogogas isoladas ou em associação antes da irradiação local com dose única de 15 Gy de radiação X. A irradiação resultou num maior atraso para o início da salivação e redução do fluxo salivar tanto na parótida quanto na submandibular e sublingual. Os grupos irradiados e tratados previamente com isoproterenol e metacolina associada à fenilefrina, e apenas com fenilefrina apresentaram uma menor redução no fluxo salivar na glândula parótida, respectivamente em tempos precoces e tardios, quando comparado com o grupo irradiado. Para a glândula submandibular não houve alteração significativa precoce para a taxa do fluxo salivar após o tratamento prévio com os sialogogos. Nos tempos tardios a taxa de fluxo foi significativamente menos reduzida após o tratamento prévio à irradiação com fenilefrina e metacolina. Os autores puderam concluir que o tratamento com fenilefrina e em maior extensão com metacolina + fenilefrina, previamente à irradiação, protegeu as glândulas parótida e submandibular do dano tardio radioinduzido, porém tal efeito não estava atribuído à prévia degranulação das células secretoras, e sim devido à ativação de mensageiros relacionados aos receptores destas drogas.

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

observada proteção para a glândula submandibular. Os autores sugerem a existência de outro mecanismo de dano às glândulas submandibulares, não estando relacionado à presença dos íons metálicos nos grânulos de secreção.

Coppes *et al.* (2001) investigaram a hipofunção da glândula parótida do início ao fim após a irradiação. Investigaram também a capacidade de receptores agonistas muscarínicos ou adrenérgicos utilizados como pré-tratamento em diminuir os danos causados pela radiação nas glândulas salivares. Para isso, os ratos foram irradiados localmente, com ou sem pré-tratamento com fenilefrina, isoproterenol, pilocarpina, metacolina, ou metacolina + fenilefrina. O fluxo salivar, a secreção de amilase, o número de células glandulares e a histologia glandular foram monitorados seqüencialmente durante 240 dias após a irradiação. Com isso, esses autores observaram quatro fases na perda de função de glândulas salivares induzida por radiação. A primeira fase (0-10 dias) foi caracterizada por um rápido declínio do fluxo salivar sem alterações na secreção de amilase ou no número de células acinares. A segunda fase (10–16 dias) consistiu de uma redução na secreção de amilase salivar e paralelamente na perda de células acinares. Não houve alteração no número de células e secreção de amilase na terceira fase (60–120 dias). A quarta fase (120–240 dias) caracterizou-se por uma maior deterioração da função glandular, com aumento no número de células acinares, embora com um tecido morfológicamente fraco. Todas as drogas poderiam reduzir os efeitos da radiação na primeira e segunda fase, mas isso não aconteceu na quarta fase, exceto com o uso de metacolina + fenilefrina como pré-tratamento. Essa combinação de drogas mostrou reduzir os danos causados pela radiação em todas as fases (precoces e tardias). Isto abre perspectivas para o desenvolvimento de métodos clínicos aplicáveis visando poupar as glândulas parótidas dos danos radioinduzidos, em indivíduos submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço.

A proliferação de tecidos com células danificadas é uma característica importante na recuperação de lesão tecidual induzida por radiação. Para

compreender sobre o processo regenerativo no tecido das glândulas salivares, a atividade proliferativa foi medida em função do tempo, nos diferentes compartimentos de célula epitelial de glândula parótida e glândula submandibular de ratos após uma dose única localizada de 15 Gy de radiação X. Índices de rotulação com bromodeoxiuridina foram determinados antes e dez horas, e 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 30 dias após a irradiação. Em ambas as glândulas, a irradiação X causou a morte celular e o ciclo celular manifestou demora durante o primeiro dia. Três dias após a irradiação, a proliferação celular começou no ducto intercalado. Seis dias depois da irradiação, a proliferação foi também observada em ácinos e túbulos granulares convolutos. Os ductos estriados mostraram atividade proliferativa começando no sexto dia (parótida) e décimo dia (submandibular). Os resultados deste estudo sugerem que, após 15 Gy de raios X a regeneração ocorre nos compartimentos celulares. A partir desse estudo não foi possível deduzir se estas células são originárias unicamente de células progenitoras residentes no ducto intercalado ou se as células de outros compartimentos também são estimuladas. A maior atividade proliferativa foi encontrada no compartimento dos ductos intercalares da glândula parótida, o que pode estar relacionado à maior radiosensibilidade desta glândula e, portanto, uma maior demanda por reposição celular na glândula parótida (Peter *et al.*, 1994).

2.2 Vitamina E: Propriedades e Mecanismo de ação

Segundo Burton *et al.* (1983), a propagação de radicais livres é uma reação em cadeia levando a peroxidação lipídica e é interrompida pela formação de um complexo de radicais livres de vitamina E. Na sua essência, a vitamina E contribui com um hidrogênio e ela mesma é oxidada. A vitamina E oxidada é rapidamente reduzida em diversos sistemas, especialmente pela vitamina C. A vitamina E é uma mistura de tocoferóis, sendo o alfa-tocoferol o maior e mais reativo deles.

Em um estudo realizado por Felemovicius *et al.* (1995), com o objetivo de testar a vitamina E como um potencial radioprotetor para o pequeno intestino de rato, utilizaram soluções de fosfato de alfa-tocoferol e acetato de alfa-tocoferol. As soluções foram colocadas cirurgicamente no lúmen do intestino do rato trinta minutos antes da irradiação (1100 cGy). Após cinco dias os ratos foram sacrificados e avaliou-se a sobrevivência das criptas, estado da mucosa e preservação das células caliciformes. Em um estudo complementar, suplementos de alfa-tocoferol foram administrados na dieta dez dias antes da irradiação, e a mesma seqüência de irradiação foi realizada. As cristas, as células caliciformes e a mucosa foram significativamente protegidas dos efeitos da radiação pelo alfa-tocoferol incluso na dieta e na aplicação dentro do lúmen intestinal. Os autores concluíram que o uso de vitamina E pode resolver alguns dos problemas encontrados durante o tratamento com radiação e altas doses desse agente não apresentam efeitos adversos, agudos ou crônicos.

Em suas revisões de literatura Prasad *et al.* (2001, 2002) têm enfatizado a importância de se estabelecer uma dosagem para os antioxidantes, e recomendaram a administração diária dos mesmos em menos de 48 horas antes da irradiação. Como resultado, essa dosagem pré-determinada pode dar início a danos em células tumorais, mas não em células em condições normais antes da radioterapia. A permanência de antioxidantes pós-irradiação é importante a fim de

reduzir a taxa de reparo de células tumorais que sofreram danos pela radiação, mas não de células normais.

Manzi *et al.* (2003) realizaram uma pesquisa com a finalidade de avaliar a ação da vitamina E como radioprotetora no processo de reparação tecidual em ratos, após sofrerem um procedimento cirúrgico, que consistiu da produção de uma ferida na região dorsal anterior. Os animais foram divididos em cinco grupos: grupo CO (controle) - constituído de animais em que foi produzida somente a ferida; grupo VE - pré-tratamento com vitamina E (90 UI); grupo IR - irradiação três dias após a cirurgia; grupo VEIR - pré-tratamento com 90 UI de vitamina E e irradiação de suas bordas três dias após a cirurgia; grupo OIR - pré-tratamento com óleo de oliva e irradiação de suas bordas três dias após a cirurgia. A ação radioprotetora da vitamina E foi avaliada pela coloração por hematoxilina-eosina para análise morfológica do tecido de granulação, aos quatro, sete, catorze e vinte e um dias após a cirurgia. A análise dos resultados mostrou que o retardo no processo de reparação tecidual causado por 6 Gy de radiação de elétrons com feixe de 6 MeV não ocorreu no grupo de animais que recebeu vitamina E, mostrando-se esta substância efetiva como radioprotetora.

Ferreira *et al.* (2003) testaram se vitamina E (VE) fornece proteção da mucosa oral em pacientes que recebem radioterapia na região de cabeça e pescoço. Para isso, cinquenta e quatro pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe foram aleatoriamente designados para enxaguar a cavidade oral com uma solução contendo óleo, vitamina E ou placebo antes de cada sessão de radioterapia (2 Gy) e novamente oito a doze horas mais tarde durante as cinco a sete semanas de radioterapia (RT). Os autores verificaram que a vitamina E reduziu o risco de mucosite em 36%. Dados subjetivos, no final do tratamento, revelaram que a vitamina E diminuiu a dor em alguns pacientes durante a radioterapia e que não houve influência significativa na sobrevida dos indivíduos. Assim, concluíram que a vitamina E diminuiu a incidência de

mucosite oral induzida por radioterapia em pacientes com câncer de orofaringe e cavidade oral.

A radiação gama é conhecida por causar graves danos cerebrais, e muitos agentes têm sido utilizados para neuroproteção. Neste estudo de Erol *et al.* (2003), as alterações nos níveis de peroxidação lipídica e alterações histopatológicas em tecidos do cérebro de ratos que tiveram seu corpo todo irradiado com provável lesão foram comparados àqueles que utilizaram melatonina e vitamina E para proteção. Utilizaram quarenta ratos em quatro grupos iguais. O grupo controle não recebeu radiação nem medicação. Os demais grupos receberam doses de 720cGy divididas em duas seções com intervalo de doze horas. O segundo grupo recebeu radiação, mas nenhuma medicação, o terceiro recebeu radiação acrescido de 100 mg / kg de vitamina E por dia, e o quarto grupo recebeu mais 100 mg / kg por dia de melatonina durante cinco dias. No décimo dia pós-operatório, todos os ratos foram decapitados e espécimes provenientes do córtex parietal foram analisados quanto às alterações histopatológicas. No exame histopatológico, a melatonina reduziu significativamente as taxas de edema, necrose e degeneração neuronal, enquanto a vitamina E reduziu apenas a necrose. Nenhuma substância foi capaz de evitar a vasodilatação. Em conclusão, a melatonina pode ser útil na prevenção de alterações patológicas dos danos cerebrais secundários, como resultado dos radicais livres de oxigênio gerados por radiação.

Ramos *et al.* (2005) avaliaram o efeito radioprotetor da vitamina E na função salivar de ratos irradiados e analisaram a concentração de proteína total na saliva. Nesse estudo, os autores tiveram o cuidado de avaliar este efeito em três tempos (quatro horas, oito dias e trinta dias após a irradiação) para observar os danos agudos e crônicos. A partir dos dados obtidos, concluíram que a vitamina E foi eficiente como radioprotetor na função salivar trinta dias após a irradiação e não houve alteração na concentração de proteína após a mesma.

Segundo Bairati *et al.* (2005), muitos pacientes com câncer utilizam suplementos vitamínicos antioxidantes com a esperança de melhorar o resultado das terapias convencionais e de reduzir os efeitos adversos desses tratamentos. Assim, um estudo randomizado foi realizado para determinar se a suplementação com antioxidantes vitamínicos pode reduzir a ocorrência e gravidade dos efeitos adversos da radioterapia e melhorar a qualidade de vida sem comprometer a eficácia do tratamento. Este estudo duplo-cego foi realizado com 540 indivíduos com câncer de cabeça e pescoço tratados com radioterapia. Estes indivíduos foram divididos em grupos, sendo que um recebeu suplementação com α -tocoferol (400 UI / d), e outro recebendo β -caroteno (30mg/d) e outro placebo durante três anos. Ao final, puderam concluir que a suplementação com altas doses de α -tocoferol e β -caroteno durante a radioterapia pode reduzir a gravidade dos efeitos adversos do tratamento. No entanto, este julgamento sugere que o uso de altas doses de antioxidantes como terapia adjuvante possa comprometer a eficácia do tratamento radioterápico.

Chitra & Shiamala (2008) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos da radiação e do α -tocoferol no fluxo salivar e em parâmetros salivares selecionados de pacientes com câncer de boca. Esses pacientes foram divididos em quatro grupos sendo, um grupo tratado com radioterapia durante três semanas, o segundo grupo tratado com radioterapia durante seis semanas, o terceiro grupo tratado com radioterapia durante três semanas sendo suplementado com α -tocoferol e o último grupo tratado com radioterapia durante seis semanas sendo suplementado com α -tocoferol. Toda a saliva foi coletada antes, durante e ao final da radioterapia, e simultaneamente foi realizada a suplementação com α -tocoferol nesses pacientes que pertenciam aos grupos suplementados. Foram analisados: fluxo salivar, pH, atividade da amilase, proteína total e quantidade de sódio e potássio. A redução do fluxo salivar, da atividade da amilase, de proteína total e sódio, e o aumento do pH e potássio ocorreu no grupo tratado por

radioterapia durante seis semanas sem suplementação. Quando o α -tocoferol foi administrado, uma melhora significativa nesses níveis pôde ser observada. Os autores concluíram que os pacientes tratados durante seis semanas de radioterapia apresentaram xerostomia. A redução no fluxo salivar promoveu crescimento da microflora bacteriana e causou dificuldade na fala e deglutição afetando a qualidade de vida dos pacientes. O α -tocoferol aumentou o fluxo salivar e manteve o meio bucal adequado nos pacientes com câncer de boca tratados por radioterapia.

Wambi *et al.* (2008) objetivaram determinar se uma dieta usando suplemento composto por L-selenometionina, vitamina C, succinato de vitamina E, ácido e lipóico-N-acetil cisteína poderia melhorar a sobrevivência de camundongos após irradiação de todo o corpo. Verificaram que o uso de antioxidantes aumentou significativamente a sobrevivência dos ratos após exposição a uma dose potencialmente letal de raios X, quando administrado antes ou após a irradiação. O pré-tratamento de animais com doses de antioxidantes significativamente mais elevadas, resultou em um aumento de células brancas do sangue e neutrófilos em sangue periférico quatro e vinte e quatro horas após 1 Gy e 8 Gy. Observaram também que os antioxidantes são eficazes na prevenção de linfopenia periférica somente após baixa dose de radiação. A suplementação com antioxidantes foi também associada com o aumento de células da medula óssea após irradiação. A manutenção da dieta antioxidante foi associada com uma melhor recuperação da medula óssea após doses subletais ou potencialmente letais de radiação. Concluíram que suplementação oral com antioxidantes parece ser eficaz para radioproteção de células hematopoéticas e melhora da sobrevivência, e a modulação da apoptose é uma consequência do mecanismo de radioproteção do sistema hematopoiético pelos antioxidantes.

Sezen *et al.* (2008) utilizaram ratos para determinar os efeitos da vitamina E e da L-carnitina, individualmente ou combinadas, nos danos radioinduzidos no cérebro e retina. Através dos dados obtidos, concordaram com os demais estudos

em relação ao papel radioprotetor e antioxidante da vitamina E e da L-carnitina. No entanto, o uso combinado dessas substâncias não apresentou um aumento no efeito radioprotetor das mesmas.

Koizumi *et al.* (2008) avaliaram o ácido ascórbico glucosídeo (AsAG) e o monoglicosídeo de α -tocoferol (TMG) I-II, como inibidores de efeitos colaterais de radioterapia e quimioterapia. A radioterapia foi aplicada nos pacientes com metástase cerebral ou em coluna vertebral, os quais receberam 30Gy/10fr/2W. Os pacientes com câncer de mama ou câncer de colo uterino receberam quimioterapia com protocolos individuais. Os pacientes receberam por via oral de 1.0mg/kg TMG logo após a quimioterapia ou 200mg/kg de AsAG duas a três horas antes de cada quimioterapia. A administração oral de 200mg/kg de AsAG antecipadamente ou 1.0mg/kg TMG imediatamente após a radioterapia ou quimioterapia impediu os efeitos secundários, tais como, náusea severa, ou diarreia freqüente. Concluíram que estas vitaminas hidrossolúveis inibiram efetivamente o efeito adverso de radioterapia ou quimioterapia.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo neste trabalho foi avaliar, por meio de análise morfométrica, o efeito radioprotetor da vitamina E em glândulas parótidas de ratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto dessa pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, sob protocolo de número 600-1.

Para a realização desse estudo foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), com idade entre oito e dez semanas de vida e peso variando entre 250 – 300g, procedentes do Biotério Central da Unicamp. Durante a pesquisa, os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, em local com temperatura e umidade controladas e com ciclo alternado de doze horas claro-escuro. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum*.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, contendo seis animais cada, conforme descrito abaixo e, sucintamente, apresentado na Tabela 1.

- Óleo: formado por animais que receberam três doses de 4ml/kg de óleo de oliva via enteral, administradas 24, 48 e 72 horas antes da *sham* irradiação;
- Óleo Irradiado: formado por animais que receberam três doses de 4ml/kg de óleo de oliva via enteral, administradas 24, 48 e 72 horas antes da *sham* irradiação;
- Irrradiado: formado por animais que foram somente irradiados;
- Vitamina E: formado por animais que receberam três doses de vitamina E (360mg/kg) via enteral, administradas 24, 48 e 72 horas antes do processo de irradiação;

- Vitamina E Irradiado: Formado por animais que receberam três doses de vitamina E (360mg/kg) via enteral, administradas 24, 48 e 72 horas antes do processo de irradiação.

Tabela 1 – Diferentes grupos experimentais utilizados neste estudo

Grupos	Nº de ratos	Dose de radiação γ	Tratamento
Óleo	12	–	4 ml/kg corpóreo de óleo de oliva
Óleo Irradiado	12	15 Gy	4 ml/kg corpóreo de óleo de oliva
Irrradiado	12	15 Gy	–
Vitamina E	12	–	360 mg/kg corpóreo acetato de α -tocoferol
Vitamina E Irradiado	12	15 Gy	360 mg/kg corpóreo acetato de α -tocoferol

Terapêutica

Nos animais pertencentes aos grupos Óleo e Óleo Irradiado, foram administrados 4 ml/Kg de peso corpóreo de óleo de oliva; enquanto que nos grupos Vitamina E e Vitamina E Irradiado, foram administrados 360mg/Kg de peso corpóreo de vitamina E, diluídos 4ml/Kg de peso corpóreo de óleo de oliva . A administração foi realizada via enteral, utilizando-se tubo plástico, tipo catéter,

conectado a uma seringa de 3 ml, permitindo que as soluções fossem depositadas diretamente no estômago dos animais (Figura 1).



Figura 1 – Administração via enteral das soluções

Processo de Irradiação

Todos os animais foram pesados e anestesiados via intramuscular, com 0,1ml/kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® Agribrands do Brasil Ltda., Paulínea, SP, Brasil) e 0,05ml/kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Xylasina (Rompum®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Depois de anestesiados, os animais foram colocados sobre a maca e posicionados a fim de serem irradiados, sendo exposta somente a região de cabeça e pescoço (Figura 2). Para tanto, a dimensão do campo de irradiação foi de 30 x 30cm e a distância focal de 100cm (Figura 3). Os animais foram irradiados com ⁶⁰Co por meio de uma exposição aguda única de 15 Gy por meio do aparelho Alcion CGR II (Siemens) com uma saída de 84 cGy/min, operando com energia de 1,25 MeV. Os animais do grupo óleo e do grupo vitamina E não foram irradiados.



Figura 2 – Animais posicionados para irradiação.

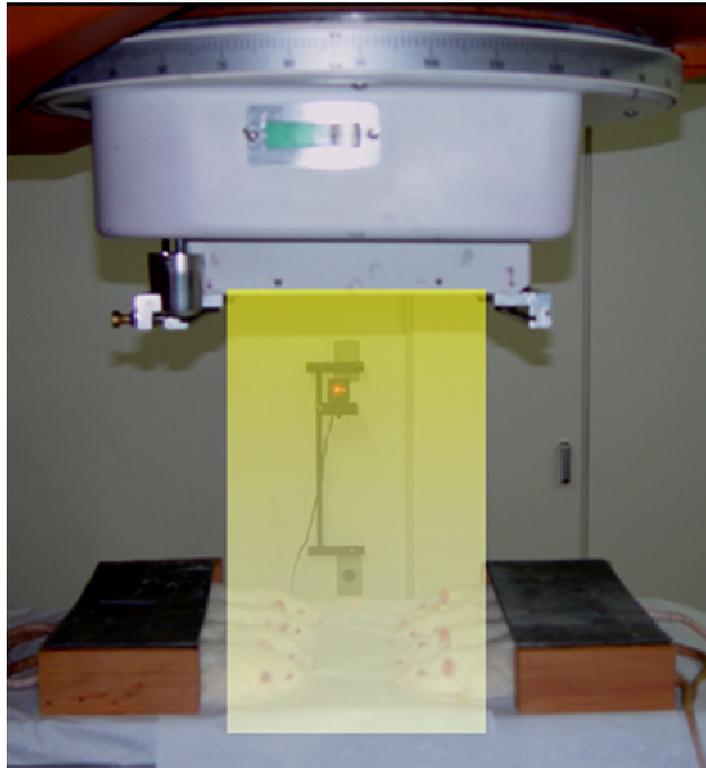


Figura 3 – Ilustração do campo de irradiação.

Obtenção e Preparo das peças

Nos tempos previamente estabelecidos de oito horas e trinta dias após a irradiação, os animais foram anestesiados via intramuscular com 0,1ml/kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® Agribrands do Brasil Ltda., Paulínea, SP, Brasil) e 0,05ml/kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Xylasina (Rompum®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foram removidas as glândulas parótidas dos lados direito e esquerdo e as peças foram fixadas em formol tamponado a 10% por no mínimo setenta e duas horas. Após a obtenção das peças, os animais foram sacrificados por prolongamento anestésico.

Procedimento Histológico

As peças já fixadas foram desidratadas em soluções crescentes de etanol, diafanizadas em solução resinosa e incluídas em historesina (Leica Historesin - Flüssigkeit, Alemanha). Cortes semi-seriados transversais com 1µm de espessura foram obtidos utilizando-se um micrótomo Leica RM 2155 (Leica - Flüssigkeit, Alemanha) com navalha de tungstênio, de acordo com o protocolo estabelecido pela disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. A partir de cada bloco foram obtidas três lâminas histológicas, contendo quatro cortes alternados, com intervalo de trinta cortes entre eles. Os cortes foram montados em lâminas, corados com Hematoxilina e Eosina, sendo posteriormente utilizados para avaliação morfológica.

Avaliação das lâminas

Os quatro cortes montados em cada uma das lâminas foram utilizados para avaliação morfológica. De cada corte foram escolhidos três campos histológicos, totalizando doze campos por lâmina. Para essa análise utilizou-se o microscópio de luz Zeiss (Axiolab – Zeiss – Berlim, Alemanha) com lente objetiva no aumento de 40X, micro-câmera acoplada (Sony CCD IRIS RGB Color – Japão), utilizada

para realização das fotografias, e o programa KS400 2.0 – Kontron Eletronics (Munich, Alemanha).

Na amostragem, os campos histológicos foram escolhidos a intervalos regulares, assim teve-se uma amostra representativa de cada corte (Taga, Sesso e Pardini, 1998). As frações do volume glandular ocupadas pelos ácinos, ductos intercalares, ductos estriados foram determinadas por meio do método de impacto de pontos, utilizando-se grade reticulada com área de $12.600\mu\text{m}^2$ (Figura 4).

Após a análise exploratória, os dados relacionados aos ácinos, ductos estriados e ductos intercalares foram avaliados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

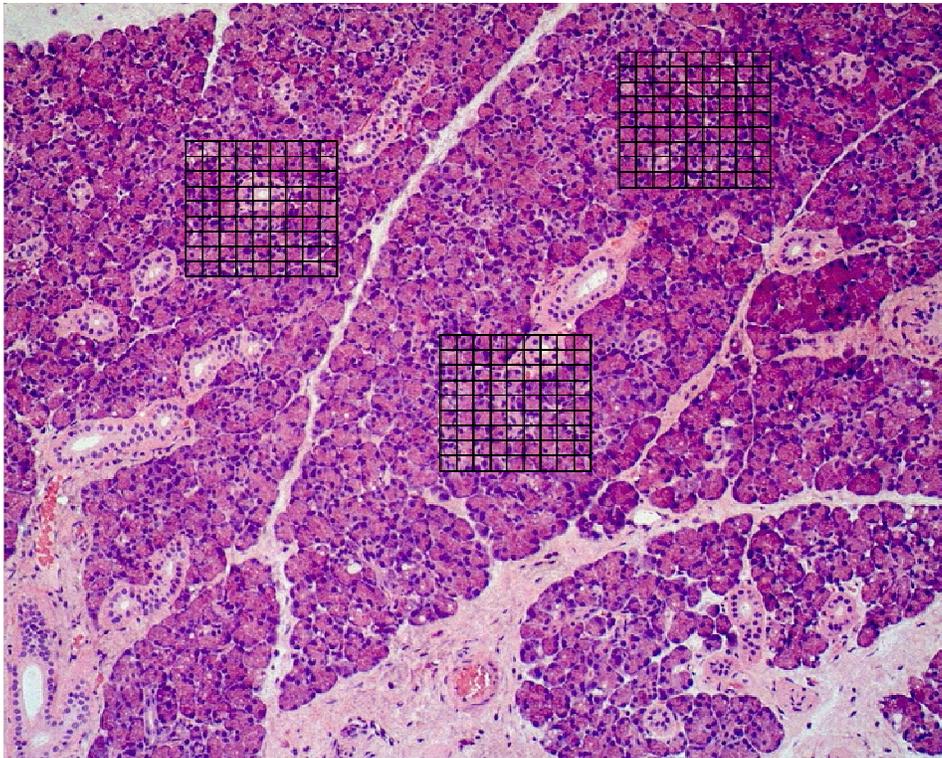


Figura 4 – Grades reticuladas posicionadas aleatoriamente sobre corte histológico.

5. RESULTADOS

A análise morfométrica dos ácinos no tempo de oito horas mostrou uma maior quantidade dessas estruturas no grupo Óleo Irrradiado seguido pelos grupos Irrradiado, Vitamina E, Óleo e Vitamina E Irrradiado. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada somente entre os grupos Óleo Irrradiado e Vitamina E Irrradiado.

No tempo de trinta dias, os grupos Óleo e Vitamina E apresentaram valores próximos, não diferindo estatisticamente entre si. O grupo Vitamina E Irrradiado apresentou maior quantidade de ácinos quando comparado ao grupo Irrradiado, não diferindo entre si, porém ambos os grupos apresentaram redução significativa na quantidade de ácinos em relação ao Óleo.

Quando os grupos foram avaliados em função do tempo, observou-se redução significativa nos grupos Óleo Irrradiado e Irrradiado aos trinta dias (Tabela 2). O grupo Irrradiado e Vitamina E apresentaram uma leve redução em relação ao grupo Óleo Irrradiado. O grupo Vitamina E Irrradiado apresentou um número de células reduzido em relação aos grupos Óleo Irrradiado, Irrradiado e Vitamina E.

As glândulas parótidas dos animais sacrificados trinta dias após a irradiação foram submetidas à análise morfométrica, a qual mostrou o grupo Óleo com o maior número de células em relação aos dois tempos e aos demais grupos. Os grupos Óleo Irrradiado e Irrradiado apresentaram redução no número de ácinos tanto em relação aos animais dos mesmos grupos sacrificados após oito horas como em relação aos grupos Óleo, Vitamina E e Vitamina E Irrradiado no tempo de trinta dias. O grupo Vitamina E se manteve com o mesmo número de células acinares nos dois tempos, apresentando-se com maior número dessas células em relação aos grupos Óleo Irrradiado, Irrradiado e Vitamina E Irrradiado. O grupo Vitamina E Irrradiado também não se alterou entre os tempos de oito horas e trinta

dias, mas se apresentou com o número de ácidos reduzido em relação ao grupo Óleo e Vitamina E (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise morfométrica das células acinares nos tempos de 8 horas e 30 dias após a irradiação

Grupos	8hs	30 dias
Óleo	24,57 (2,79) Bab	28,83 (2,12) Aa
Óleo Irradiado	29,37 (3,60) Aa	21,72 (1,28) Bc
Irradiado	27,28 (2,99) Aab	20,97 (3,93) Bc
Vitamina E	24,70 (4,80) Aab	26,96 (1,50) Aab
Vitamina E Irradiado	24,03 (3,08) Ab	23,05 (1,10) Abc

As análises morfométricas dos ductos intercalares e estriados não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos em ambos os tempos estudados (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Análise morfométrica dos ductos intercalares nos tempos de 8 horas e 30 dias após a irradiação

Grupos	8hs	30 dias
Óleo	2,93 (0,53) Aa	1,80 (0,39) Aa
Óleo Irradiado	3,08 (1,53) Aa	2,95 (1,23) Aa
Irradiado	3,21 (1,20) Aa	2,76 (1,72) Aa
Vitamina E	2,80 (0,80) Aa	1,44 (0,71) Aa
Vitamina E Irradiado	2,66 (1,37) Aa	2,90 (0,92) Aa

Tabela 4 – Análise morfométrica dos ductos estriados nos tempos de 8 horas e 30 dias após a irradiação

Grupos	8hs	30 dias
Óleo	2,71 (1,38) Aa	2,43 (0,85) Aa
Óleo Irradiado	2,08 (0,67) Aa	2,41 (0,85) Aa
Irradiado	2,38 (1,16) Aa	3,41 (1,13) Aa
Vitamina E	3,26 (1,27) Aa	2,26 (0,94) Aa
Vitamina E Irradiado	3,36 (1,14) Aa	2,26 (0,68) Aa

Nas lâminas histológicas é possível visualizar as estruturas avaliadas morfometricamente (Figura 5).

Exemplos das lâminas histológicas de cada um dos grupos estudados podem ser visualizadas nas figuras 6, 7, 8, 9 e 10. No tempo de trinta dias nos grupos Irradiado e Óleo Irradiado, percebe-se o volume e a quantidade dos ácinos reduzidos e o aumento do espaço entre essas estruturas.

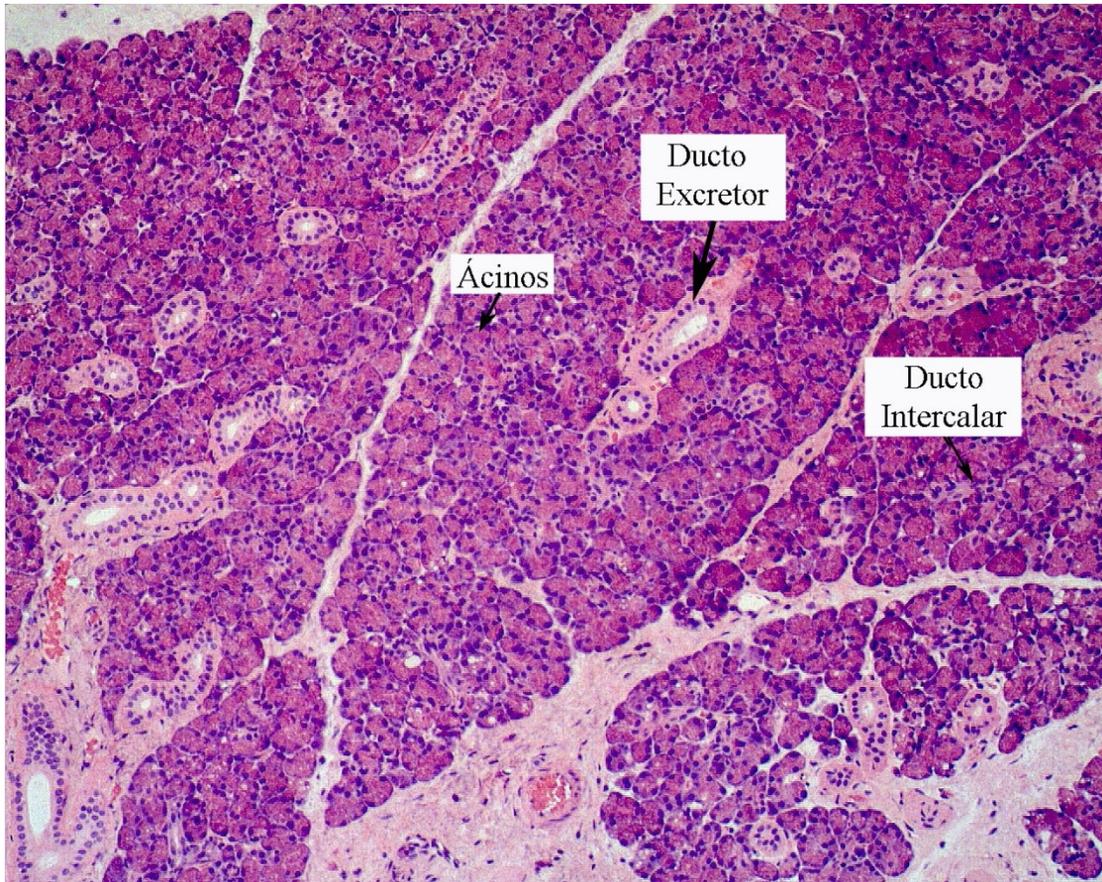


Figura 5 – Estruturas analisadas morfometricamente

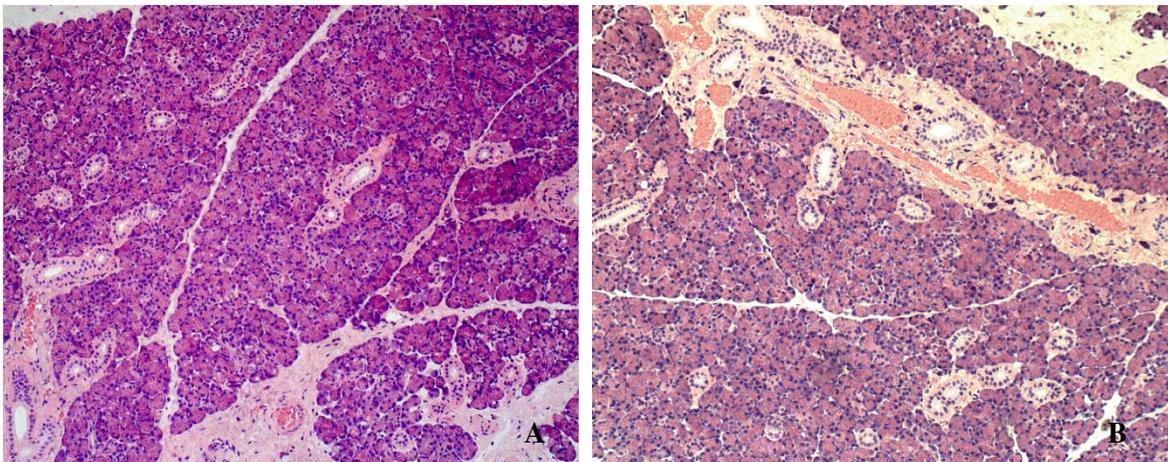


Figura 6 – Grupo Óleo nos tempos de oito horas (A) e trinta dias (B)

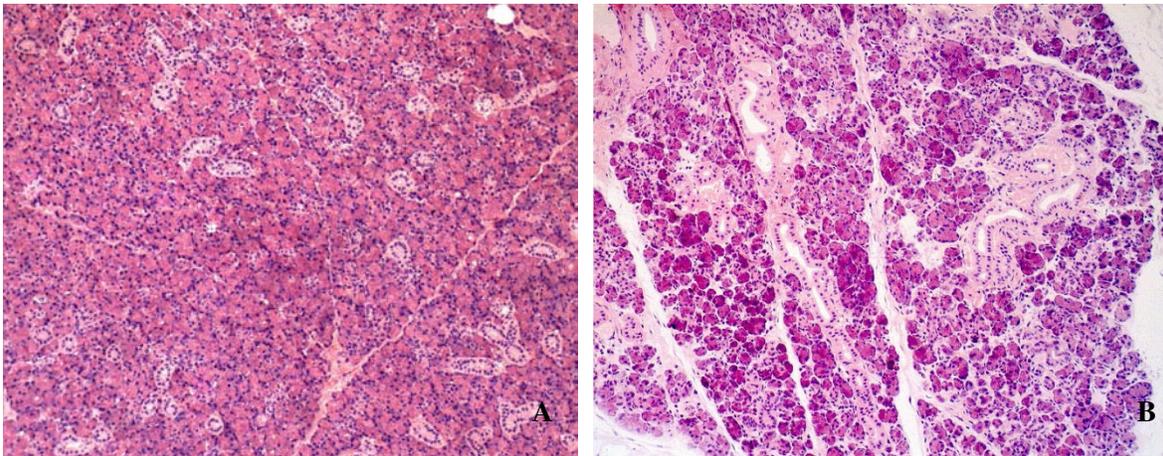


Figura 7 – Grupo Óleo Irradiado nos tempos de oito horas (A) e trinta dias (B)

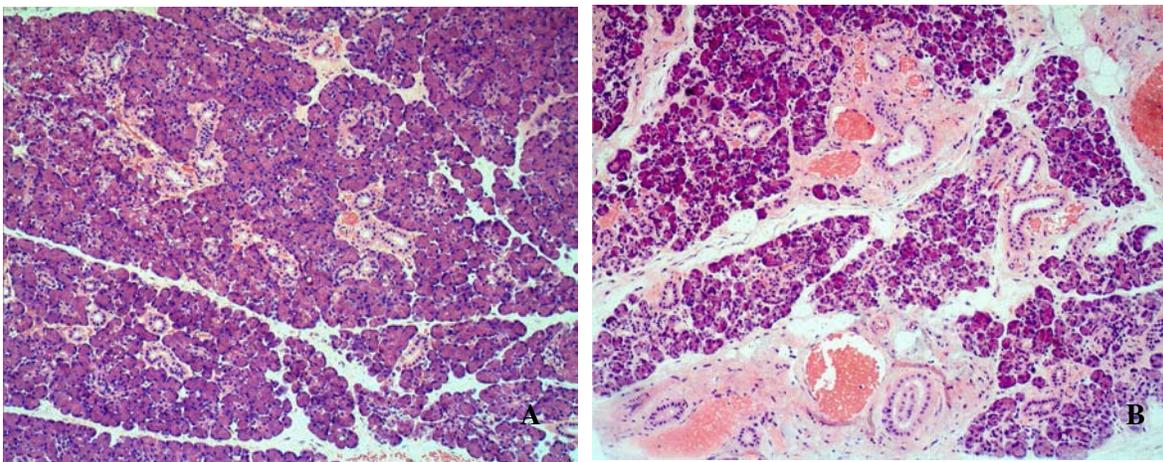


Figura 8 – Grupo Irradiado nos tempos de oito horas (A) e trinta dias (B)

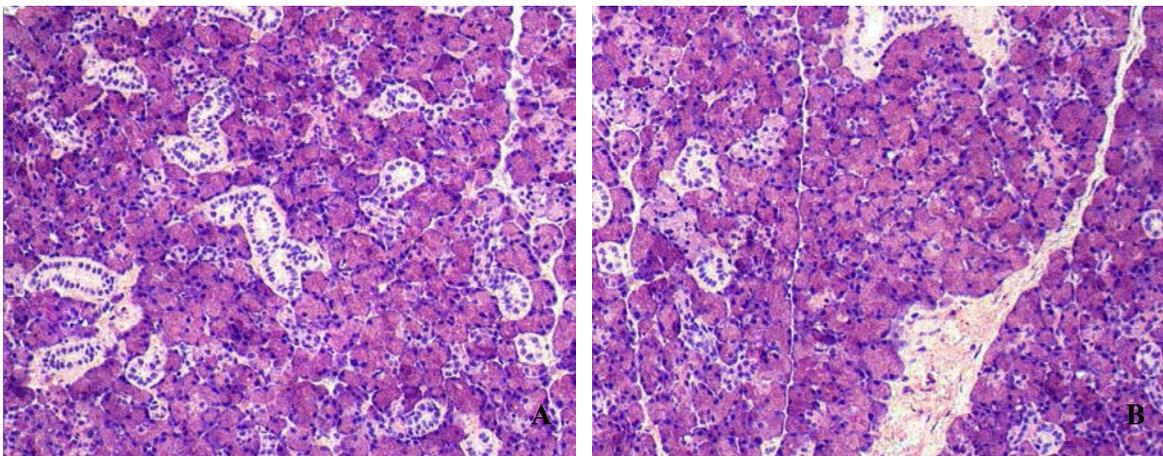


Figura 9 – Grupo Vitamina E nos tempos de oito horas (A) e trinta dias (B)

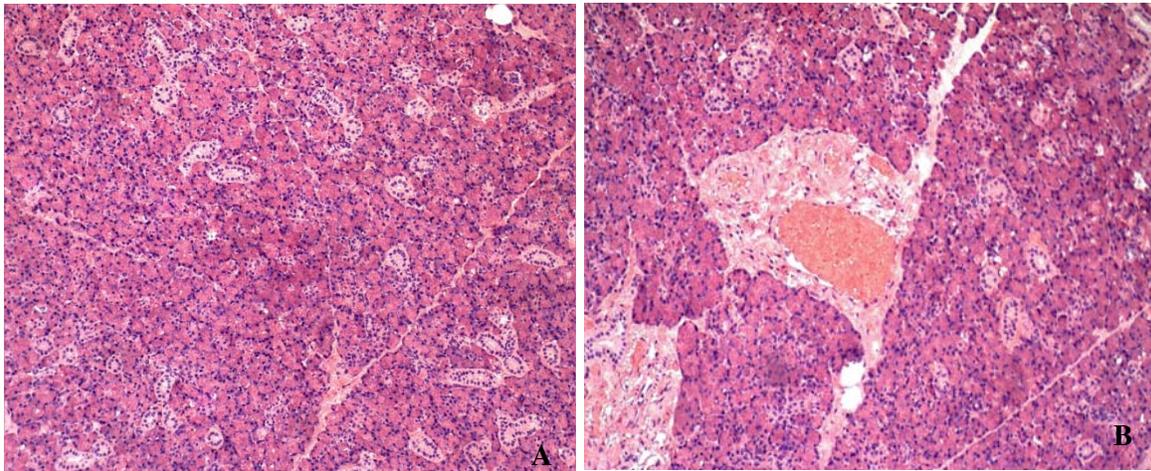


Figura 10 – Grupo Vitamina E Irrradiado nos tempos de oito horas (A) e trinta dias (B)

6. DISCUSSÃO

A saliva é um importante componente de defesa da cavidade bucal. Por isso, as alterações salivares quantitativas e qualitativas predisõem o paciente a uma variedade de problemas que podem se desenvolver como resultado direto ou indireto da redução da produção salivar.

A radiosensibilidade das glândulas salivares tem sido estudada a fim de se deduzir o mecanismo da hipofunção salivar. Isso se deve a grande preocupação dos profissionais envolvidos no tratamento em manter a qualidade de vida dos pacientes. A hipofunção salivar causa xerostomia desencadeando alterações na microflora oral, mucosa oral e tecidos duros; além de prejudicar a mastigação, a deglutição, a fala e o paladar.

As glândulas salivares têm apresentado uma resposta precoce à radiação. Essa resposta aguda é inesperada, uma vez que as células que compõem as glândulas são bem diferenciadas. Algumas hipóteses foram descritas tentando explicar esses danos agudos radioinduzidos.

Stephens *et al.* (1989) apresentaram um estudo mostrando que o comprometimento funcional agudo foi causado diretamente pela apoptose de células acinares, e não pelo resultado de processos inflamatórios e circulatórios comprometidos durante as injúrias vasculares.

Em 1984, Abok *et al.* sugeriram que a radiosensibilidade das glândulas salivares estaria relacionada à presença de grânulos secretores ricos em metais pesados (Zn, Fe e Mn) revelando maior sensibilidade à radiação, devido à indução provocada pela catalisação de metais na peroxidação lipídica pela radiação ionizante. Peter *et al.* (1995) investigaram esta hipótese estimulando a degranulação de ácidos das glândulas salivares, prévia à irradiação, com isoproterenol. Observaram que a recuperação da função glandular é atribuída predominantemente pelo estímulo que o isoproterenol causa na regeneração

celular e não pela ação de degranulação e remoção desses íons metálicos das células. Nagler *et al.* (1998b) também avaliaram a capacidade protetora da degranulação e concordam com Peter *et al.* (1995), concluindo que existe outro mecanismo de dano às glândulas submandibulares, que não está relacionado à presença de íons metálicos nos grânulos de secreção.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que, de acordo com a análise morfológica, houve uma redução no número de ácinos no tempo de trinta dias, quando comparado ao tempo de oito horas, tanto no grupo irradiado quanto no grupo óleo irradiado, ou seja, o efeito crônico da radiação gama nas glândulas parótidas foi a redução do número de ácinos e não a proliferação celular observada no estudo de Peter *et al.*, em 1995. Ressalta-se que essa proliferação observada nesse estudo, segundo esses autores, foi devido à ação do isoproterenol que foi usado com o objetivo de causar a degranulação dos ácinos. Ainda com relação ao maior número de ácinos observado nesses grupos oito horas após a irradiação, quando comparado aos demais grupos, sustenta a afirmação de Konings *et al.* em 2005, que citam não haver perda celular nos primeiros dias após a irradiação. Em outro estudo, (Peter *et al.*, 1994), em que a atividade proliferativa foi medida em função do tempo, os ductos intercalares apresentaram proliferação celular a partir do terceiro dia, e seis dias após a irradiação, a atividade proliferativa foi observada em ácinos e nos túbulos granulares convolutos. Quando se avalia o grupo Vitamina E, observa-se um aumento no número de ácinos, indicando uma ação benéfica deste anti-oxidante na glândula. Já no grupo vitamina E irradiado não houve aumento no número de ácinos, entretanto, esta diferença não se apresentou estatisticamente significativa entre os tempos oito horas e trinta dias e nem quando se compara o grupo Vitamina E com o grupo Vitamina E irradiado no tempo de trinta dias. Como neste grupo foi utilizado um agente reconhecidamente danoso, justifica-se o menor número de ácinos, no entanto, pode-se sugerir que a Vitamina E atuou neste grupo como radioprotetor para essas estruturas. Esse efeito danoso da radiação

pode ser observado na redução significativa do número de ácinos nos grupos Óleo Irradiado e Irradiado entre os tempos de oito horas e trinta dias.

Avaliando-se agora os resultados para os ductos intercalares observa-se que a citação de Konings *et al*, em 2005, de que não há perda celular nos primeiros dias após a irradiação também é verdadeira, uma vez que essas estruturas apresentam-se em maior número nos grupos Óleo Irradiado e Irradiado, quando comparados aos demais grupos.

Os ductos estriados assim como os ductos intercalares, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos nos dois tempos avaliados. Entretanto, observa-se que para o tempo de oito horas, a Vitamina E apresentou efeito radioprotetor, uma vez que no grupo Vitamina E Irradiado houve maior número de ductos estriados em comparação ao grupo Óleo Irradiado. Também como no caso dos ácinos, no tempo de trinta dias, embora não se tenha maior número de ductos estriados no grupo Vitamina E Irradiado em comparação ao grupo Vitamina E, deve-se considerar que o primeiro sofreu ação danosa da radiação.

Uma vez que as estruturas avaliadas são constituintes da glândula parótida, estes têm papel fundamental na fisiologia dessa estrutura. Assim, danos nesses constituintes afetarão a função da glândula, ou seja, a produção de saliva e fluxo salivar.

Na pesquisa realizada por Coopes *et al*. (1997) nos tempos tardios a taxa de fluxo salivar foi significativamente menos diminuída após o tratamento prévio com fenilefrina e metacolina. Neste caso a degranulação foi realizada por drogas sialogogas que protegeram as glândulas parótida e submandibular do dano tardio radioinduzido, porém tal efeito não estava atribuído à prévia degranulação das células secretoras, e sim devido à ativação de mensageiros relacionados aos receptores destas drogas. Em 2001, os mesmos autores continuando seus estudos com essas drogas, encontraram resultados mostrando que a combinação

de fenilefrina com metacolina reduziu os danos causados pela radiação em todas as fases (precoces e tardias), em relação ao fluxo salivar.

O problema dessas hipóteses é que já foi demonstrado não ocorrer perda celular nos primeiros dias após a irradiação, mas há redução drástica do fluxo salivar. Isso ocorre, pois a secreção aquosa é seletivamente prejudicada na fase aguda, devido às alterações na permeabilidade e fluidez das membranas plasmáticas. Assim, embora não haja perda celular, a função celular está alterada. A hipofunção das glândulas salivares pode ser melhorada pelo tratamento profilático com receptores agonistas específicos. O mais provável mecanismo de ação que explica a enigmática radiosensibilidade precoce para efeitos da radiação é seletivo para o dano à membrana plasmática de células secretoras, perturbando receptores muscarínicos e estimulando a secreção aquosa. Mais tarde o dano se deve principalmente a clássica morte das células progenitoras mitóticas, levando a uma dificuldade em substituir as células secretoras, mas também é causado por danos ao meio extracelular, impedindo o bom funcionamento celular (Konings *et al.*, 2005).

Neste estudo foi preconizada a metodologia utilizada por Ramos *et al.* (2005). No trabalho desses autores não houve redução do fluxo salivar na fase aguda nos grupos estudados. A vitamina E foi eficiente no seu efeito radioprotetor no tempo de trinta dias e o grupo Vitamina E Irrradiado manteve o fluxo salivar estável nesse momento. No presente estudo, o número de ácinos apresentou-se reduzido nos grupos Óleo Irrradiado e Irradiado trinta dias após a irradiação, em relação à fase aguda (oito horas), e o fluxo salivar nesses grupos, no estudo de Ramos *et al.* (2005), também se mostrou reduzido no mesmo tempo. O grupo Vitamina E Irradiado não apresentou alteração significativa no número de ácinos, concordando mais uma vez com o trabalho de Ramos *et al.* (2005), mostrando a ação da vitamina E protegendo os ácinos e mantendo o fluxo salivar.

O controle do fluxo salivar também pode ser conseguido com a utilização da radioterapia tridimensional de intensidade modulada (IMRT). Como os danos

radioinduzidos são dose-dependentes, a IMRT apresenta essa proteção no fluxo salivar. Com a capacidade de direcionar bem o feixe para a região tumoral, a dose de radiação que atinge as glândulas é menor que na radioterapia convencional. A redução do fluxo salivar se apresenta exponencial, numa razão aproximada de 4% por Gray de dose média na glândula parótida (Chao *et al.*, 2001). Infelizmente, esse tipo de radioterapia é realizado por aparelhos de alto custo e sua disponibilidade ainda é limitada. A radioterapia convencional para tratamento de câncer de cabeça e pescoço inclui doses fracionadas que totalizam 50 a 70 Gy de exposição, e as glândulas parótidas são expostas a doses maiores que 60 Gy, ocorrendo danos permanentes sem recuperação da hipofunção glandular (Dobbs *et al.*, 1999).

Felemovicius *et al.* (1995) apresentaram um estudo em que os resultados estão de acordo com os dados encontrados no presente estudo, mostrando o efeito radioprotetor da vitamina E em intestino de ratos. Nesse caso, o acetato de α -tocoferol e o fosfato de α -tocoferol foram colocados diretamente no intestino dos animais. Tomou-se esse cuidado, pois segundo os autores a radioproteção da vitamina E é mais pronunciada quando sua aplicação é tópica, no caso da mucosa intestinal. Mas, o enriquecimento da dieta com vitamina E, em longo prazo, promove uma proteção significativa na mucosa intestinal em relação aos efeitos agudos da radiação. Nesse contexto, a interpretação dos resultados dos efeitos no lúmen intestinal através do pré-tratamento via oral é ambígua. A absorção da vitamina E ocorre pela via intestinal e pelo sistema circulatório, se concentrando nos lipídeos da membrana bilipídica. Assim, quando administrada via oral, a absorção da vitamina E parece ser incompleta. Entretanto, os autores concluem que apesar de não ser possível clinicamente realizar essa aplicação tópica na mucosa intestinal, altas doses de vitamina E não apresentam efeitos colaterais, podendo então ser utilizada. Em relação a essa administração de altas doses de antioxidantes, Bairati *et al.* (2005) sugerem que seu uso adjuvante pode comprometer a eficácia do tratamento radioterápico.

A vitamina E também mostrou sua radioproteção diminuindo a incidência de mucosite radioinduzida (Sagowski *et al.*, 2003), na reparação de feridas abertas irradiadas com dose única de 6 Gy, (Manzi *et al.*, 2003) e sendo capaz de evitar necrose em danos cerebrais radioinduzidos (Sezen *et al.*, 2008) de ratos irradiados, o que foi constatado por análises histológicas (Erol *et al.*, 2003). Esse efeito radioprotetor também foi observado em medulas ósseas de ratos irradiados, em que a suplementação oral com antioxidantes incluindo a vitamina E pareceu ser eficaz na proteção de células hematopoiéticas, através da modulação da apoptose, e na melhora da sobrevivência dos animais (Wambi *et al.*, 2003). Esse efeito na melhora da sobrevivência pôde ser verificado em pacientes tratados com quimioterapia e radioterapia na região cerebral e coluna vertebral. A administração prévia de ácido ascórbico glucosídico e monoglicosídico de α -tocoferol, impediram efeitos secundários como náusea severa e diarreia freqüente (Koizumi *et al.*, 2008). Bairati *et al.* (2005) também observaram a redução da gravidade dos efeitos adversos do tratamento quando há suplementação com altas doses de α -tocoferol e β -caroteno.

É evidente o efeito radioprotetor da vitamina E nesses estudos, mas é importante se estabelecer uma dosagem para os antioxidantes, afim de que ocorra um efeito anti-tumoral nas células cancerígenas, mas não em células normais antes da radioterapia (Prasad *et al.* 2001, 2002).

7. CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais utilizadas, conclui-se que a vitamina E demonstrou efeito radioprotetor em glândulas parótidas de ratos irradiados.

REFERÊNCIAS*

Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1984; 45(4): 443-60.

Bairati I, Meyer F, Gélinas M, Fortin A, Nabid A, Brochet F, Mercier JP, Têtu B, Harel F, Abdous B, Vigneault E, Vass S, del Vecchio P, Roy† J. Randomized Trial of Antioxidant Vitamins to Prevent Acute Adverse Effects of Radiation Therapy in Head and Neck Cancer Patients. *J Clin Oncol*. 2005; 23(24):5805-5813.

Burton GW, Cheeseman KH, Doba T, et al. Vitamin E as an antioxidant in vitro and in vivo. In *Biology of Vitamin E*. London: Pitman, 1983; 4-18.

Chao KS, Deasy JO, Markman J, Haynie J, Perez CA, Purdy JA, Low DA. A prospective study of salivary function sparing in patients with head-and-neck cancers receiving intensity-modulated or three-dimensional radiation therapy: initial results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;49(4):907-16.

Cheng VS, Downs J, Herbert D, Aramany M. The function of the parotid gland following radiation therapy for head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1981; 7(2):253-8.

Chitra S, Shyamala Devi CS. Effects of radiation and α -tocoferol on saliva flow rate, amylase activity, total protein and electrolyte levels in oral cavity cancer. *Indian J Dent Res*. 2008; 19(3):213-18.

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

De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Coopes RP, Zeilstra LJW, Vissink A, et al. Early to late sparing of radiation damage to the parotid gland by adrenergic and muscarinic receptor agonists. *Br J Cancer*. 2001;85(7):1055-1063.

Erol FS, Topsakal C, Ozyeren MF, Kaplan M, Ilhan N, Ozercan IH, Yildiz OG. Protective effects of melatonin and vitamin E in brain damage due to gamma radiation. An experimental study. *Neurosurg Rev*, 2004; 27:65–69.

Felemovicius I, Bonsack ME, Baptista ML, Delaney JP. Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol). *Annals of Surgery*, 1995; 222 (4): 504-510.

Ferreira PR, Fleck JF, Diehl A, Barletta D, Braga Filho A, Barletta A, Ilha I. Protective effect of alpha-tocopherol in head and neck cancer radiation-induced mucositis: A double-blind randomized trial. *Head Neck*. 2004;26(4):313-21.

Koizumi M, Nishimura T, Kagiya T. Clinical trial of adverse effect inhibition with glucosides of vitamin C and vitamin E in radiotherapy and chemotherapy. <http://www.cancerjournal.net> on Thursday, December 18, 2008.

Konings AWT, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2005; 62(4):1187–1194.

Manzi FR, Bóscolo FN, Almeida SM, Tuji FM. Morphological study of the radioprotective effect of vitamin E (dl-alpha-tocopheril) in tissue reparation in rats. *Radiol bras*. 2003; 36(6): 367-371.

Nagler RM. Short- and long-term functional vs morphometrical salivary effects of irradiation in a rodent model. *Anticancer Res*. 1998b;18:315-320.

Peter B, Van Waarde MAWH, Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Konings AWT. Radiation-induced cell proliferation in the parotid and submandibular glands of the rat. *Radiat Res.* 1994; 140:257-265.

Peter B, Van Waarde MA, Vissink A, s-Gravenmade EJ, Konings AWT. The role of secretory granules in radiation-induced dysfunction of rat salivary glands. *Radiat Res.* 1995;141(2):176-82.

Prasad KN, Cole WC, Kumar B, et al: Scientific rationale for using high-dose multiple micronutrients as an adjunct to standard and experimental cancer therapies. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20:450S–463S.

Prasad KN, Cole WC, Kumar B, et al: Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy. *Cancer Treat Rev.* 2002; 28:79-91.

Ramos FMM, Pontual MLA, Almeida SM, Bóscolo FN, Tabchury CPM, Novaes PD. Evaluation of radioprotective effect of vitamin E in salivary dysfunction in irradiated rats. 2006; 51:96-101.

Sagowski C, Wenzel S, Tesche S, Jenicke L, Jaehne M. Investigation of radiosialadenitis during fractionated irradiation: sialoscintigraphical findings in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003; 260(9):513-7.

Sezen O, Ertekin MV, Demircan B, Karslıođlu Y, Erdođan F, Koçer Y, Çalıık Y, Gepdiremen A. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced brain and retinal damages. *Neurosurg Ver.* 2008;31:205–213.

Stephens LC, Schultheiss TE, Small SM, Ang KK, Peters LJ. Response of parotid gland organ culture to radiation. *Radiat Res.* 1989;120(1):140-53.

Wambi C, Sanzari J, Wan XS, Nuth M, Davis J, Ying-Hui Ko, Sayers CM, Baran M, Ware JH, Kennedyl AR. Dietary antioxidants protect hematopoietic cells and improve animal survival after total-body irradiation. *Radiation Research*. 2008; 169, 384-396.

ANEXO



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 600-1, sobre "AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DE VITAMINA E EM GLÂNDULA PARÓTIDA DE RATOS IRRADIADOS" sob a responsabilidade de Prof.Dr. Pedro Duarte Novaes/Flávia Maria de Moraes Ramos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03 de Outubro de 2003.

CERTIFICATE

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

Campinas, 03 de Outubro de 2003.

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

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP