



MAYRA CRISTINA YAMASAKI

**AVALIAÇÃO DO MELOXICAM COMO SUBSTÂNCIA
RADIOPROTETORA EM MANDÍBULAS
DE RATOS IRRADIADOS**

**EVALUATION OF MELOXICAM AS A RADIATION-
PROTECTIVE AGENT ON MANDIBLES
OF IRRADIATED RATS**

Piracicaba

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

MAYRA CRISTINA YAMASAKI


**AVALIAÇÃO DO MELOXICAM COMO SUBSTÂNCIA
RADIOPROTETORA EM MANDÍBULAS
DE RATOS IRRADIADOS**

**EVALUATION OF MELOXICAM AS A RADIATION-
PROTECTIVE AGENT ON MANDIBLES
OF IRRADIATED RATS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Radiologia Odontológica, na Área de Radiologia Odontológica.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Deborah Queiroz de Freitas França

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Mayra Cristina Yamasaki e orientada pela Prof.^a Dr.^a Deborah Queiroz de Freitas França.


Assinatura do(a) Orientador(a)

Piracicaba

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Heloisa Maria Ceccotti - CRB 8/6403

Y14a Yamasaki, Mayra Cristina, 1988-
Avaliação do meloxicam como substância radioprotetora em mandíbulas de ratos irradiados / Mayra Cristina Yamasaki. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Deborah Queiroz de Freitas França.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Radiação ionizante. 2. Protetores contra radiação. 3. Anti-inflamatórios não esteroides. I. Freitas, Deborah Queiroz de, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of meloxicam as a radiation-protective agent on mandibles of irradiated rats

Palavras-chave em inglês:

Radiation, ionizing

Radiation-protective agents

Anti-inflammatory agents, non-steroidal

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Mestra em Radiologia Odontológica

Banca examinadora:

Deborah Queiroz de Freitas França [Orientador]

Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes

Amaro Ilídio Vespasiano Silva

Data de defesa: 25-02-2015

Programa de Pós-Graduação: 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 25 de Fevereiro de 2015, considerou a candidata MAYRA CRISTINA YAMASAKI aprovada.

Deborah Queiroz de Freitas

Prof. Dra. DEBORAH QUEIROZ DE FREITAS FRANÇA

Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes

Prof. Dr. SÉRGIO LÚCIO PEREIRA DE CASTRO LOPES

Amaro Ilídio Vespasiano Silva

Prof. Dr. AMARO ILÍDIO VESPASIANO SILVA

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito radioprotetor do anti-inflamatório não esteroide meloxicam na prevenção da osteorradionecrose, na reparação alveolar e na resistência óssea em mandíbulas de ratos irradiados. Para isso, 40 ratos *Wistar* machos foram divididos em 4 grupos (n=10): controle (GC), irradiado (GI), meloxicam (GM) e meloxicam irradiado (GMI). Aos 75 dias de vida, foi administrado dose única de 0,2 mg/kg de meloxicam nos animais dos grupos GM e GMI. Uma hora depois, realizou-se a irradiação dos animais dos grupos GI e GMI com dose única de 15 Gy de radiação X na região de mandíbula. Decorridos 40 dias, foi realizado a exodontia bilateral dos primeiros molares inferiores nos animais, os quais foram mortos após 15 dias (n=5) e 30 dias (n=5). Utilizou-se a microtomografia computadorizada para avaliação da reparação alveolar, por meio da análise dos parâmetros da microestrutura trabecular óssea, como: volume tecidual total, volume ósseo, fração de volume ósseo, espessura trabecular média, número trabecular médio e separação trabecular média; e o teste de flexão para a avaliação da resistência óssea. A Análise de Variância um fator, com teste *post hoc* de Tukey, demonstrou que, aos 15 dias, o volume ósseo, a fração de volume ósseo e a espessura trabecular média foram significativamente superiores nos grupos GC e GM comparados aos grupos GI e GMI; já a separação trabecular média teve resultado estatístico inferior no grupo GI em relação aos demais. Aos 30 dias, houve diferença significativa apenas na separação trabecular média, cujo resultado estatístico foi inferior no grupo GI em comparação aos grupos GC e GM, não tendo o grupo GMI diferido estatisticamente dos demais. Quanto à resistência óssea, o grupo GI foi significativamente inferior em relação aos grupos GC e GM, não tendo o grupo GMI diferido estatisticamente dos demais. Concluiu-se, assim, que foi observado ausência de osteorradionecrose clínica e que o meloxicam, embora não tenha demonstrado evidente efeito radioprotetor, apresentou efeito positivo na separação trabecular média da microestrutura trabecular óssea da reparação alveolar e na resistência óssea.

Palavras-chave: Radiação ionizante. Protetores contra radiação. Anti-inflamatórios não esteroides.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the possible radioprotective effect of the non-steroidal anti-inflammatory drug meloxicam on the prevention of osteoradionecrosis, alveolar socket healing and bone strength in the mandibles of irradiated rats. Forty male Wistar rats were divided into 4 groups (n=10): control (CG), irradiated (IG), meloxicam (MG), and meloxicam irradiated (MIG). When the animals were 75 days old, a single dose of 0.2 mg/kg meloxicam was administered to the animals in the MG and MIG groups. One hour later, the animals in the IG and MIG groups were irradiated with a single 15 Gy dose of X-rays in the mandible region. Forty days later, the mandibular first molars were extracted bilaterally and the animals were killed after 15 days (n=5) or 30 days (n=5). Micro-computed tomography was used to evaluate healing in the alveolar socket and trabecular bone microarchitecture features such as total volume, bone volume, bone volume fraction, trabecular number, trabecular thickness and trabecular separation were assessed. A bending test was used to evaluate bone strength. At 15 days, the one-way analysis of variance, followed by post hoc comparisons with the Tukey test, demonstrated that bone volume, bone volume fraction and trabecular thickness were significantly higher in the CG and MG groups than in the IG and MIG groups; and trabecular separation had lower statistical result in the IG group in comparison with the other groups. At 30 days, there was a significant difference only in trabecular separation, which statistical result was lower in the IG group than in the CG and MG groups, and the MIG group did not differ statistically from the others. Bone strength was significantly lower in the IG group compared with the CG and MG groups, and the MIG group did not differ statistically from the others. Therefore, it was concluded that absence of clinical osteoradionecrosis was observed and meloxicam, even though it has not demonstrated a clear radioprotective effect, had a positive effect on the trabecular separation of trabecular bone microarchitecture in alveolar socket healing and the bone strength.

Keywords: Radiation, ionizing. Radiation-protective agents. Anti-inflammatory agents, non-steroidal.

SUMÁRIO

DEDICATORIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
INTRODUÇÃO	1
PROPOSIÇÃO	5
CAPÍTULO 1: <i>Evaluation of meloxicam as a radiation protective agent on mandibular osteonecrosis in irradiated rats</i>	6
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
APÊNDICE 1: Material e métodos detalhado	29
APÊNDICE 2: Artigo na versão em português	36
ANEXO 1: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	56
ANEXO 2: Comprovação de submissão do artigo	57
ANEXO 3: Declaração de não infração de direito autoral	58

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Mário Tadashi Yamasaki** e **Júlia Cristina Ferreira Paiva Yamasaki**, por serem pessoas e pais maravilhosos, que sempre demonstrando muito amor e carinho, não mediram esforços e sacrifícios para criar e educar a mim e ao meu irmão da melhor maneira possível, por todos os princípios e conhecimentos transmitidos sobre as coisas importantes da vida e por nos ensinarem que, com dedicação e perseverança, podemos alcançar todos os nossos objetivos e sonhos. Meus infindáveis agradecimentos por me proporcionarem educação e formação de qualidade, sempre me auxiliando no desenvolvimento de uma carreira profissional e me apoiando mesmo quando decidi deixar tudo que me deram para me dedicar ao mestrado. Por isso, aos meus pais, dedico todo o meu incondicional e eterno amor e carinho.

Ao meu irmão, **Rodrigo Tadashi Yamasaki**, por ser essa pessoa que irradia felicidade, por ser meu melhor amigo, por sempre estar ao meu lado, pela cumplicidade e companheirismo, por me ajudar, incentivar e apoiar em todos os momentos. Minha eterna gratidão por seu imenso amor e carinho, que são igualmente recíprocos.

Ao meu avô paterno, **Mitsuki Yamasaki (Pedrinho)**, por sempre torcer por mim, pela preocupação com o meu bem estar e por todo carinho demonstrado.

À memória da minha avó paterna, **Dolores Fujii Yamasaki**, e dos meus avós maternos, **Antônio Luiz de Paiva** e **Maria de Lourdes Ferreira Paiva**, os quais, ainda que não estejam mais presentes fisicamente, possuem papel fundamental na minha vida, sendo exemplos a serem seguidos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, sem o qual nada seria possível, por apontar os melhores caminhos e guiar os meus passos, conferindo sabedoria e paciência para concretização de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus **tios** e **tias**, pelo carinho, pelas palavras de incentivo e por estarem sempre torcendo por minha felicidade e para que alcance meus objetivos.

Aos meus **primos** e **primas**, pela amizade, por sempre compartilharem comigo momentos incríveis, me alegrando, me distraíndo e suavizando as minhas angústias e preocupações.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na figura do **Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge**, e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), na figura do **Diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**, por possibilitarem a obtenção do meu título de mestra.

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Deborah Queiroz de Freitas França**, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, pelos ensinamentos, por ter auxiliado e participado ativamente de cada etapa desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos pela amizade, por brigar por mim quando foi preciso, por me aconselhar, por me incentivar e pela confiança em mim depositada.

Aos professores da Área de Radiologia Odontológica, **Prof.^a Dr.^a Deborah Queiroz de Freitas França**, **Prof. Dr. Frab Norberto Boscolo**, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto** e **Prof.^a Dr.^a Solange Maria de Almeida**, por me ajudarem a descobrir que a Radiologia é a minha grande paixão dentro da Odontologia, por todo conhecimento transmitido, pela colaboração no meu mestrado, pela disponibilidade e pela atenção, estando sempre com as portas abertas para solucionar dúvidas e auxiliar no que for preciso. Um agradecimento especial ao **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto** pela amizade e por sempre exigir o máximo de nós, ainda que sendo tão crítico e exigente, porém justo, certamente contribui para nos tornarmos melhores profissionais.

Aos doutorandos e coautores deste trabalho, **Gina Delia Roque Torres** e **Yuri Nejaim**, fundamentais para este trabalho, sem a ajuda dos quais eu não teria conseguido realizá-lo. Agradeço, ainda, pela grande amizade que construímos, a qual desejo que só cresça cada vez mais, e por me apoiarem em todos os momentos.

Ao **Prof. Dr. Frab Norberto Boscolo**, ao **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo** e ao **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes**, por terem participado da comissão examinadora do meu exame de qualificação; ao **Prof. Dr. Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes** e ao **Prof. Dr. Amaro Ilídio Vespasiano Silva** por terem participado da comissão julgadora da minha defesa de mestrado; tendo todos contribuído para essa dissertação.

A todos do Biotério da FOP/UNICAMP, em especial ao bioterista **Wanderlei Francisco Vieira**, a todos do Centro de Microscopia e Imagem da FOP/UNICAMP, sob coordenação do **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes**, ao técnico da Área de Materiais Dentários da FOP/UNICAMP **Marcos Blanco Cangiani** e a todos do Centro de Oncologia (CEON) do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba, em especial à técnica **Eliete Aparecida Camargo de Lima**, por terem auxiliado na execução desse trabalho.

A todos os funcionários da FOP/UNICAMP, especialmente aos da Área de Radiologia Odontológica, **Giselda Heliete Gonçalves**, **José Fernando Souza Andrade**, **Luciane Aparecida Duarte Sattolo** e **Waldeck Ribeiro Moreira**, por serem sempre muito atenciosos com todos nós da pós-graduação. Um agradecimento especial aos técnicos **José Fernando Souza Andrade** e **Waldeck Ribeiro Moreira**, por não hesitarem em transmitir seus conhecimentos e contribuírem imensamente para o nosso aprendizado, e à secretária **Luciane Aparecida Duarte Sattolo**, por ser tão eficiente e estar sempre disposta a nos ajudar no que for preciso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos professores do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, **Prof. Dr. Luiz Roberto Coutinho**

Manhães Júnior e Prof. Dr. Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes, por me incentivarem a fazer o curso de mestrado em Radiologia Odontológica na FOP/UNICAMP.

À minha turma de mestrado, **Danieli Moura Brasil, Eliana Dantas da Costa, Gustavo Machado Santaella, Leonardo Vieira Peroni e Luciana Jácome Lopes**, pela amizade, por compartilharem dessa etapa da minha vida e por terem me proporcionado ótimos momentos, os quais desejo que se repitam muitas vezes.

A todos os pós-graduandos da Área de Radiologia Odontológica, pela convivência, pelo respeito, pelo compartilhamento de experiências e conhecimentos. Um agradecimento especial aos doutorandos **Débora de Melo Távora, Gina Delia Roque Torres, Maria Beatriz Carrazzone Cal Alonso, Thiago de Oliveira Gamba e Yuri Nejaim** e atual pós-doutorando **Amaro Ilídio Vespasiano Silva**, por terem nos recebido tão bem, nos auxiliando no período de adaptação e demonstrando grande amizade, e, ainda, ao doutorando **Thiago de Oliveira Gamba**, por ter me ajudado a entrar no mestrado antes mesmo de me conhecer, se tornando o meu grande conselheiro durante o mestrado.

À amiga **Danieli Moura Brasil**, por me ensinar que dividir um apartamento com alguém é muito fácil, desde que esse alguém seja ela. Agradeço, pela fácil convivência, por todos os momentos compartilhados, pela sua infinita paciência, por estar sempre de bom humor e por ser uma grande amiga.

Ao amigo **Leonardo Vieira Peroni**, por ser essa pessoa incrivelmente especial, por estar sempre ao meu lado, por me escutar em todos os momentos, por me aconselhar, me incentivar e me apresentar a uma amiga tão querida como a **Flávia Medeiros Saavedra de Paula**. Agradeço imensamente por ser mais do que um grande amigo, por ser um irmão que a vida me deu, e desejo do fundo do coração que a nossa amizade seja sempre a mesma.

Às minhas grandes amigas, **Gláucia Helena de Oliveira Labinas, Marcelle Quintanilha Estefano e Mariana da Costa Lessa**, pela amizade verdadeira de tantos anos, por estarem presentes em todos os momentos, por me alegrarem e me incentivarem quando mais preciso.

INTRODUÇÃO

A neoplasia maligna de cabeça e pescoço é a quinta neoplasia mais frequente no mundo, estimando-se uma incidência de 780 mil novos casos por ano, dos quais 90% são classificados como carcinoma de células escamosas, sendo a cavidade oral o sítio anatômico mais acometido por essa alteração patológica (Colombo e Rahal, 2009).

Os métodos tradicionais de tratamento para as neoplasias malignas são radioterapia, cirurgia e quimioterapia, estando o protocolo terapêutico baseado na localização, no grau de malignidade e no estadiamento clínico das mesmas, assim como na condição de saúde do paciente (Grimaldi et al., 2005; Colombo e Rahal, 2009; Cabrera et al., 2013). A radioterapia é um método tradicional no tratamento de neoplasias malignas de cabeça e pescoço, sendo o princípio básico de ação da mesma fundamentado na utilização de radiação ionizante, a qual promove danos principalmente ao material genético das células, resultando em redução da reprodutibilidade e morte celular. Entretanto, embora o efeito primário da radioterapia seja combater as células neoplásicas, apresenta também efeitos secundários sobre as células sadias adjacentes (Grimaldi et al., 2005; Cabrera et al., 2013).

Apesar de novos protocolos de radioterapia estarem em contínuo desenvolvimento para o aprimoramento do tratamento das neoplasias malignas, invariavelmente haverá algum efeito secundário sobre as células sadias adjacentes, resultando em complicações clínicas, as quais podem ser imediatas ou tardias. As complicações clínicas imediatas decorrentes da radioterapia de cabeça e pescoço são observadas, geralmente, nos primeiros 90 dias de radioterapia, sendo as mais frequentes: mucosite, dermatite, disgeusia e xerostomia; já as tardias, desenvolvem-se após esse período, sendo as mais frequentes: xerostomia severa, dificuldade na mastigação, deglutição e fala, fibrose, atrofia, trismo e aumento na susceptibilidade a infecções bucais, lesões cariosas e periodontais e osteorradionecrose. A presença de tais complicações apresenta impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, devendo ser consideradas no planejamento, no decorrer e posteriormente à radioterapia (Fischer e Epstein, 2008; Cabrera et al., 2013).

A osteorradionecrose é uma das mais severas complicações clínicas decorrentes da radioterapia, sobretudo por apresentar características complexas e tratamento desafiador

(Grimaldi et al., 2005; Teng e Futran, 2005). De maneira geral, a osteorradionecrose pode ser entendida como uma necrose isquêmica do osso desencadeada pela radiação ionizante (Grimaldi et al., 2005). Clinicamente, apresenta-se como uma ferida em gengiva ou mucosa com exposição óssea, não relacionada à neoplasia, na região envolvida pela radioterapia, podendo incluir sinais e sintomas como dor, dificuldade de mastigação, trismo, drenagem de secreção purulenta, presença de fístula e fratura patológica (Grimaldi et al., 2005; Teng e Futran, 2005; Fischer e Epstein, 2008).

Embora muito estudada, a etiopatogenia da osteorradionecrose ainda não foi completamente elucidada. A teoria mais recente é a da alteração da fisiologia óssea decorrente de um processo de fibroatrofia induzida pela radiação ionizante. De acordo com a mesma, inicialmente, ocorre um processo inflamatório local crônico não específico, causado pela radiação ionizante sobre os tecidos, desencadeando hiperemia vascular, formação de edema, destruição de células endoteliais e trombose, promovendo necrose da microvascularização e isquemia local, seguido de um aumento progressivo de tecido fibrótico na região. Assim, é possível observar, no tecido ósseo, fibrose dos espaços medulares e do periósteo, bem como a redução da vascularização, a qual resulta na diminuição do transporte de nutrientes e de células de defesas. Conseqüentemente, há um aumento da taxa de morte celular, causando prejuízo da manutenção e da reparação óssea, e, ainda, aumento da susceptibilidade à instalação de infecções no osso (Grimaldi et al., 2005; Teng e Futran, 2005; Jegoux et al., 2010).

A alteração da fisiologia óssea induzida pela radiação ionizante pode ser considerada uma alteração prolongada; desse modo, pacientes submetidos à radioterapia estão sujeitos ao desenvolvimento de osteorradionecrose por toda a vida, mesmo que essa ocorra mais frequentemente nos três primeiros anos (Grimaldi et al., 2005; Fischer e Epstein, 2008). De todos os ossos da região de cabeça e pescoço, a mandíbula é o que exibe maior incidência de osteorradionecrose, visto que apresenta um menor número de vasos sanguíneos e, por ser um osso mais compacto, é capaz de absorver uma maior dose de radiação (Grimaldi et al., 2005; Teng e Futran, 2005; Fischer e Epstein, 2008; Jegoux et al., 2010).

Outros fatores podem ser considerados predisponentes no desenvolvimento da osteorradionecrose, sendo os principais: dose de radiação, presença de infecção e trauma.

Doses de radiação maiores que 60 Gy, as quais são habitualmente empregadas no protocolo convencional de radioterapia de cabeça e pescoço, apresentam grandes riscos de induzir osteorradionecrose (Grimaldi et al., 2005; Teng e Futran, 2005; Fischer e Epstein, 2008). A existência de infecções de origem dentária, na presença da menor imunidade apresentada pelo tecido ósseo irradiado, pode exacerbar e evoluir para osteorradionecrose; logo, é necessário que seja realizada uma adequação do meio bucal previamente ao tratamento com radioterapia (Grimaldi et al., 2005). Além disso, a ocorrência de traumas após a irradiação, sejam de natureza mecânica ou cirúrgica, aumentam a probabilidade de desenvolver osteorradionecrose (Grimaldi et al., 2005; Teng e Futran, 2005; Fenner et al., 2010; Damek-Poprawa et al., 2013).

Com o intuito de amenizar as complicações clínicas decorrentes da radioterapia, diversas substâncias radioprotetoras, ou seja, que buscam reduzir os efeitos secundários da radioterapia sobre as células sadias, têm sido amplamente estudadas (Hofer et al., 2006, 2008, 2011; Rocha et al., 2009; Weiss e Landauer, 2009; Freitas et al., 2012; Alok et al., 2013; Felice et al., 2014). Recentemente, tem-se investigado o possível efeito radioprotetor dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e resultados positivos têm sido observados (Hofer et al., 2006, 2008; Alok et al., 2013).

Os AINEs, por meio da inibição da enzima ciclo-oxigenase (Cox), impedem a conversão do ácido araquidônico em mediadores teciduais, como as prostaglandinas e os tromboxanos. Existem basicamente duas isoformas da Cox: a Cox-1, que é constitutivamente expressa em diversos tecidos, fazendo parte da função fisiológica normal dos mesmos; e a Cox-2, que não é habitualmente detectada na maioria dos tecidos, sendo estimulada na presença de alterações como o processo inflamatório. Os AINEs convencionais promovem a inibição tanto da Cox-1 quanto da Cox-2, podendo desencadear reações adversas indesejáveis, especialmente, ao sistema gastrointestinal, decorrente da ação sobre a Cox-1. Por outro lado, os AINEs seletivos da Cox-2 parecem apresentar uma menor ocorrência de tais reações adversas e, portanto, têm sido preferencialmente utilizados ao invés dos convencionais (Lin et al., 2002; Colombo e Rahal, 2009; Hofer et al., 2011).

A radiação ionizante utilizada na radioterapia é capaz de promover a indução de mediadores da inflamação no tecido normal, principalmente pela ativação da Cox-2, podendo

promover prejuízos sobre o mesmo (Hofer et al., 2006), assim justificando a utilização dos AINEs como substância radioprotetora. Além disso, tem-se sugerido que a inibição da Cox-2 possa contribuir para o tratamento de neoplasias malignas, assim como para a prevenção de metástases, considerando-se os AINEs uma promissora substância quimioterápica (Lin et al., 2002; Colombo e Rahal, 2009).

Diante da severidade e complexidade da osteorradição decorrente da radioterapia de cabeça e pescoço, acredita-se na necessidade da investigação da atuação de possíveis substâncias radioprotetoras no desenvolvimento da mesma. Entretanto, embora a etiopatogenia da osteorradição possa estar relacionada a um processo inflamatório do tecido ósseo induzido pela radiação ionizante, a ação dos AINEs sobre a mesma ainda não foi estudada.

PROPOSIÇÃO

O presente estudo, proposto em experimentação animal, teve como objetivo avaliar o possível efeito radioprotetor do AINE meloxicam na prevenção da osteorradionecrose, na reparação alveolar e na resistência óssea em mandíbulas de ratos irradiados.

CAPÍTULO 1¹

Evaluation of Meloxicam as a Radiation-Protective Agent on Mandibular Osteonecrosis in Irradiated Rats

Mayra C. Yamasaki, DDS,* Gina D. Roque-Torres, MSc,* Yuri Nejaim, MSc,*
Deborah Q. Freitas, PhD*

*Department of Oral Diagnosis, Division of Oral Radiology, Piracicaba Dental School,
State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Evaluation of Meloxicam on Osteonecrosis

Conflict of interest: none

Corresponding Author:

Mayra Cristina Yamasaki

Av. Limeira, 901, PO Box 52

Zip Code: 13414-903

Piracicaba-SP, Brazil

Phone/Fax: + 55 19 2106-5327

E-mail: mcyamasaki@uol.com.br

¹ Ver material e métodos detalhado em Apêndice 1, artigo na versão em português em Apêndice 2, certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Anexo 1, comprovação de submissão do artigo em Anexo 2 e declaração de não infração de direito autoral em Anexo 3.

SUMMARY

We hypothesized that meloxicam could reduce damage in irradiated bone, like osteoradionecrosis, a severe complications due to radiotherapy. In this experimental animal model, the rats were irradiated and tooth was extracted in order to induce mandibular osteoradionecrosis. Moreover, micro-computed tomography and bending test were used to evaluate alveolar socket healing and bone strength, which were positively affected by meloxicam. The search for reducing radiotherapy damage is important to improve the quality of patients' life.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the possible radioprotective effect of the non-steroidal anti-inflammatory drug meloxicam on the prevention of osteoradionecrosis, alveolar socket healing and bone strength in the mandibles of irradiated rats.

Methods and Materials: Forty male Wistar rats were divided into 4 groups ($n=10$): control (CG), irradiated (IG), meloxicam (MG), and meloxicam irradiated (MIG). A single dose of 0.2 mg/kg meloxicam was administered to the animals in the MG and MIG groups. One hour later, the animals in the IG and MIG groups were irradiated with a single 15 Gy dose of X-rays in the mandible region. Forty days later, the mandibular first molars were extracted bilaterally and the animals were killed after 15 days ($n=5$) or 30 days ($n=5$). Micro-computed tomography was used to evaluate healing in the alveolar socket and trabecular bone microarchitecture were assessed. A bending test was used to evaluate bone strength.

Results: At 15 days, bone volume, bone volume fraction and trabecular thickness were significantly higher in the CG and MG groups than in the IG and MIG groups; and trabecular separation had lower statistical result in the IG group in comparison with the other groups. At 30 days, there was a significant difference only in trabecular separation, which statistical result was lower in the IG group than in the CG and MG groups. Bone strength was significantly lower in the IG group compared with the CG and MG groups.

Conclusion: Absence of clinical osteoradionecrosis was observed and meloxicam, even though it has not demonstrated a clear radioprotective effect, had a positive effect on the trabecular separation of trabecular bone microarchitecture in alveolar socket healing and the bone strength.

INTRODUCTION

Radiotherapy is an important and traditional therapy in the treatment of head and neck cancer. However, despite ongoing research on new radiotherapy protocols, ionizing radiation invariably has some side effects on normal cells, resulting in acute and late oral complications. Acute oral complications generally develop within 90 days from commencement of radiotherapy; the most common are mucositis, dermatitis, taste alterations and dry mouth. Late oral complications usually occur after 90 days, and may include chronic xerostomia, difficulties with chewing, swallowing and speaking, fibrosis, trismus, atrophy, as well as increased susceptibility to oral infections, dental caries, periodontal diseases and osteoradionecrosis. These oral complications have a negative impact on quality of life and must be considered before, during and after radiotherapy (1–3).

Osteoradionecrosis is one of the most severe oral complications of radiotherapy, mainly due to its complex features and challenging treatment. Its etiopathogenesis has not yet been fully clarified, despite considerable research. The most recent theory is based on changes in bone physiology due to a fibroatrophy process induced by ionizing radiation. Initially, there is non-specific chronic local inflammation in the tissues, leading to necrosis of microvessels and local ischemia, followed by a progressive increase in fibrotic tissue in the region. Thus, bone tissue shows fibrosis of the marrow spaces and periosteum, along with a reduction in vascularity, which decreases the transport of nutrients and white blood cells. Consequently, the rate of cell death increases, impairing bone remodelling and healing, and the susceptibility to bone infections also increases (1, 4, 5).

In order to mitigate oral complications, many radiation-protective agents have been studied with the aim of reducing the side effects due to radiotherapy on normal cells (6–13). Possible radioprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been researched recently and positive results have been observed (6, 7, 12). The ionizing radiation used in radiotherapy induces inflammation mediators in normal tissues, especially by activation of cyclooxygenase 2 (Cox-2), and damage may occur (6), thus justifying the research on NSAIDs as radiation-protective agents.

Front of the severity and complexity of osteoradionecrosis due to head and neck radiotherapy, it is important to research the possible effect of radiation-protective agents on its development. Nevertheless, even though the etiopathogenesis of osteoradionecrosis may be related to an ionizing radiation-induced inflammatory process on bone tissues, the effect of NSAIDs on it has not yet been studied. Therefore, this experimental animal model was proposed in order to evaluate the possible radioprotective effect of the NSAID meloxicam on the prevention of osteoradionecrosis, alveolar socket healing and bone strength in mandibles of irradiated rats.

MATERIALS AND METHODS

The study protocol was first approved by the Local Ethics Committee on Animal Use. Forty male Wistar rats, 75 days old and weighing around 350 g, were used. The animals were maintained in a room at a controlled temperature and relative humidity, in a light-dark cycle of 12 h, on a standard pelleted rodent diet and water ad libitum.

The animals were randomly divided into 4 experimental groups ($n=10$) according to meloxicam administration and X-rays delivery: control group (CG), without meloxicam administration and without delivery of X-rays; irradiated group (IG), without meloxicam administration and with delivery of X-rays; meloxicam group (MG), with meloxicam administration and without delivery of X-rays; meloxicam irradiated group (MIG), with meloxicam administration and with delivery of X-rays.

When the animals were 75 days old, they were anaesthetized with a single intramuscular injection of 100 mg/kg ketamine (Dopalen, Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil) and 10 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brazil). Then, a single dose of 0.2 mg/kg meloxicam (Maxicam, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brazil), as indicated by the manufacturer, was administered intraperitoneally to the animals in the MG and MIG groups. After 1 h (6, 7), the animals in the IG and MIG groups were irradiated with a single 15 Gy dose of X-rays in the mandible region. Moreover, in order to expose all the animals to the same stimuli and stresses, they were all anaesthetized and distilled water was administered to animals in the CG and IG groups instead of meloxicam.

Forty days after delivery of X-rays (14), the animals were anaesthetized again and mandibular first molars were extracted bilaterally. Half of animals were killed 15 days after tooth extraction ($n=5$) and the other half at 30 days after tooth extraction ($n=5$). Gingival healing and the presence of a fistula in the region of the extracted mandibular first molars were evaluated macroscopically before removing the hemimandibles, which were immersed for 72 h in 10% buffered formalin and stored in saline solution in a refrigerator until use.

One hemimandible from each animal was selected to evaluate healing in the alveolar socket by micro-computed tomography (micro-CT). Initially, each hemimandible

was positioned vertically and centrally in a receptacle with water inside the micro-CT scanner (SkyScan 1174; SkyScan, Kontich, Belgium) and the images were acquired using the following parameters: 50 kV, 800 μ A, 9.47 μ m pixel size, 0.45° rotation step, 180° total rotation, 3 frames and 0.5 mm aluminum filter. The images were reconstructed using NRecon software (SkyScan, Kontich, Belgium) with the following parameters: 700 sections, 1 for smoothing, 5 for ring artefact reduction, 10% of beam-hardening correction and a histogram with a dynamic range of 0.01–0.12. DataViewer software (SkyScan, Kontich, Belgium) was used to adjust the images of the hemimandibles in order to get better positioning of the distal tooth socket of the extracted mandibular first molar. The images were then evaluated using CTAn software (SkyScan, Kontich, Belgium) and only the sections including the distal tooth socket of the extracted mandibular first molar were selected to manually delineate the area showing healing in the alveolar socket. A global threshold ranging from 25 to 65 and from 25 to 80 was established for the hemimandibles of animals killed 15 and 30 days after tooth extraction, respectively. Then, three-dimensional analysis of the region of interest was performed to examine the features of the trabecular bone microarchitecture, according to Bouxsein *et al.* (15), such as total volume, bone volume, bone volume fraction (bone volume/total volume), trabecular number, trabecular thickness and trabecular separation.

The other hemimandible from each animal was used in the three-point bending test to evaluate bone strength. Each one was placed perpendicularly with the lateral surface on 2 vertical bars of the metal support in a material-testing machine (Instron 4411; Instron, Norwood, MA) with the insert centred between the bars and oriented over the molars of the hemimandible (Fig. 1). The insert deflected the hemimandible at a constant speed of 1

mm/min until it fractured and the peak load values representing bone strength were obtained in Newtons (N).

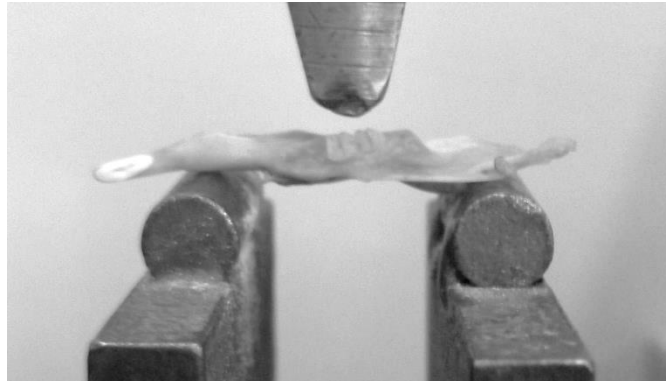


Fig. 1. Positioning of the sample for the bending test.

Data variables from the micro-CT three-dimensional analysis and the bending test were expressed as mean \pm standard deviation. The results were analyzed and compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc comparisons with the Tukey test using IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp, Armonk, NY). Statistical significance was set at $p < 0.05$. The null hypothesis under consideration was the absence of a significant statistical difference between the experimental groups.

RESULTS

The macroscopic evaluation of the region of the extracted mandibular first molars before removing the hemimandibles showed complete gingival healing and no fistula in all animals.

Tables 1 and 2 present the data on the features of the trabecular bone microarchitecture of healing in the alveolar socket for each group. At 15 days after tooth extraction (Fig. 2), total volume ($p=0.308$) and trabecular number ($p=0.060$) did not differ statistically between the groups; bone volume ($p<0.001$), bone volume fraction ($p<0.001$) and trabecular thickness ($p<0.001$) were significantly higher in the CG and MG groups than in the IG and MIG groups; trabecular separation ($p<0.001$) had lower statistical result in the IG group in comparison with the other groups. At 30 days after tooth extraction (Fig. 2), there was no significant difference between the groups concerning total volume ($p=0.940$), bone volume ($p=0.943$), bone volume fraction ($p=0.513$), trabecular number ($p=0.204$) and trabecular thickness ($p=0.299$); however, trabecular separation ($p=0.019$) had lower statistical result in the IG group than in the CG and MG groups, and the MIG group did not differ statistically from the others.

TABLE 1 Mean and standard deviation of trabecular bone microarchitecture data regarding volume analysis for each group

Group	Total Volume (mm ³)	Bone Volume (mm ³)	Bone Volume Fraction (%)	
15 days	CG	1.96±0.28 A	1.46±0.19 A	75.30±7.69 A
	IG	2.08±0.11 A	0.83±0.17 B	40.01±8.22 B
	MG	1.84±0.22 A	1.40±0.18 A	76.38±5.40 A
	MIG	2.02±0.12 A	0.94±0.16 B	46.98±9.98 B
30 days	CG	1.68±0.09 A	1.35±0.13 A	80.01±7.94 A
	IG	1.71±0.25 A	1.30±0.21 A	75.85±5.67 A
	MG	1.59±0.51 A	1.23±0.56 A	75.23±9.74 A
	MIG	1.64±0.30 A	1.34±0.29 A	81.40±6.53 A

Abbreviation: CG = control group; IG = irradiated group; MG = meloxicam group; MIG = meloxicam irradiated group. Means followed by different letters in the same column are significantly different, according to ANOVA and the Tukey test.

TABLE 2 Mean and standard deviation of trabecular bone microarchitecture data regarding trabecular analysis for each group

Group		Trabecular Number (1/mm)	Trabecular Thickness (mm)	Trabecular Separation (mm)
15 days	CG	3.73±0.22 A	0.20±0.03 A	0.16±0.05 A
	IG	3.70±0.43 A	0.11±0.02 B	0.34±0.04 B
	MG	4.43±0.53 A	0.17±0.03 A	0.16±0.04 A
	MIG	4.22±0.59 A	0.11±0.01 B	0.25±0.06 A
30 days	CG	5.28±1.02 A	0.16±0.05 A	0.10±0.02 A
	IG	3.95±1.28 A	0.21±0.05 A	0.22±0.11 B
	MG	4.91±1.30 A	0.17±0.08 A	0.11±0.01 A
	MIG	3.80±1.32 A	0.23±0.06 A	0.14±0.04 AB

Abbreviation: CG = control group; IG = irradiated group; MG = meloxicam group; MIG = meloxicam irradiated group. Means followed by different letters in the same column are significantly different, according to ANOVA and the Tukey test.

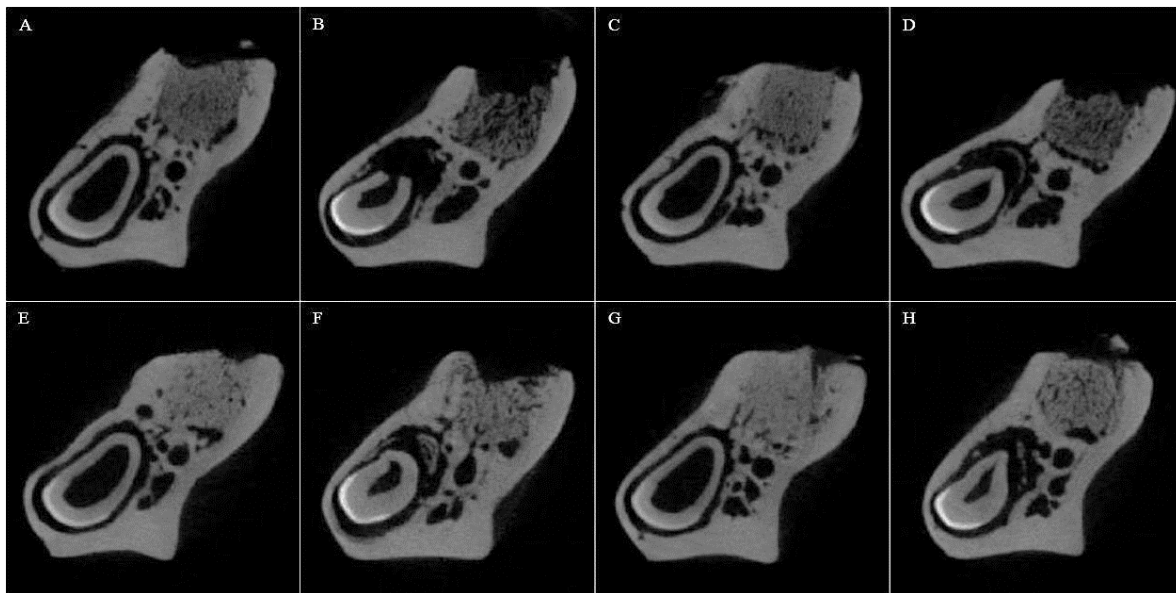


Fig. 2. Region of healing in the alveolar socket at 15 days (A–D) and 30 days (E–H) after tooth extraction. (A, E) Control group; (B, F) irradiated group; (C, G) meloxicam group; (D, H) meloxicam irradiated group.

Regarding hemimandible bone strength, the values obtained at 15 and 30 days after tooth extraction were combined because the aim was to evaluate the bone strength of the whole hemimandible and not just the region of healing in the alveolar socket. The values

for the IG group were significantly lower compared with the CG and MG groups ($p=0.006$), and the MIG group did not differ statistically from the others, as presented in Table 3.

TABLE 3 Mean and standard deviation of bone strength data for each group

Group	Bone Strength (N)
CG	92.71±13.64 A
IG	71.38±10.07 B
MG	91.68±18.32 A
MIG	82.83±13.03 AB

Abbreviation: CG = control group; IG = irradiated group; MG = meloxicam group; MIG = meloxicam irradiated group. Means followed by different letters in the same column are significantly different, according to ANOVA and the Tukey test.

DISCUSSION

Osteoradionecrosis is an important oral complication due to head and neck radiotherapy; thus, it is essential study it to understand and prevent its development. To do that, the use of experimental animal models is necessary (16, 17). With this aim, different studies were done to develop an induction model of osteoradionecrosis in animals (14, 16–20); however, none of these studies looked at preventing its development. In addition, although other studies have evaluated the possible effects of radiation-protective agents on ionizing radiation damage (6–9, 11–13), they tested the agents on acute complications and none have correlated them to late complications as osteoradionecrosis. Consequently, this study may be considered pioneering in the search for radiation-protective agents relative to prolonged changes in irradiated bone. Regarding the micro-CT evaluation, no values for trabecular bone microarchitecture features were been reported in previous studies in relation

to trabecular analysis of healing of the alveolar socket in rats, whether irradiated or not; thus, the values obtained in this study may be a reference for further studies.

In the present study, as in others (14, 19), we chose to use external irradiation, similar to the standard protocol for head and neck radiotherapy. The region chosen for irradiation was the mandible, because it is more susceptible to osteoradionecrosis than the hind limbs in animals (17); thus, lower radiation doses had to be used because the head and neck region has more radiosensitive tissues and a high radiation dose could induce early mortality of the animals (19). With regard to the fractionated irradiation protocol, although it is recommended in head and neck radiotherapy, its execution is complex in experimental animal models as it requires multiple irradiations and repeated anaesthesia, which are undesirable, because they make reproducing the study more difficult and decrease the probability of the animals surviving (5, 16, 18).

Therefore, a single dose of 15 Gy of X-rays was used in this study. According to the linear-quadratic model (21) and considering the α/β ratio, which quantifies the fractionation radiosensitivity of tissues, equals 2 for bone (14), a single dose of 15 Gy is equivalent to a total dose of about 64 Gy in a regimen with multiple 2 Gy fractions as used in the standard protocol for head and neck radiotherapy. In addition, the total dose of 64 Gy is compatible with the minimum radiation dose (60 Gy) needed to enable the development of osteoradionecrosis (1, 2, 4, 14).

With the intention to induce osteoradionecrosis, tooth extraction was also performed on the animals, similar to others studies (16, 20, 22). In order to simulate the situation in which a patient has to have a tooth extracted sometime after radiotherapy, which is contraindicated during treatment, we chose to perform tooth extraction 40 days after the

animals received irradiation, a period sufficient to reveal histological changes in bone tissue in mandibles of irradiated rats (14).

Although a radiation dose similar to 60 Gy in a multiple fraction regimen was used and tooth extraction was performed on irradiated mandibles, complete gingival healing and absence of fistula in tooth extraction regions in all animals were found in the present study. Fenner *et al.* (14) and Lerouxel *et al.* (19) were also unable to induce clinical osteoradionecrosis; however, they noted histological changes in bone tissue, which they attributed to histological features of osteoradionecrosis. Therefore, it may be supposed that the absence of clinical osteoradionecrosis does not indicate that the bone has not been altered by ionizing radiation. This is evident in this study from the delay in healing of the alveolar socket at 15 days after tooth extraction and the lower bone strength in the IG group compared with the CG group.

The total volume was similar in all groups, demonstrating that the delimited area of healing of the alveolar socket for the micro-CT three-dimensional analysis was equivalent. It also was observed that healing of the alveolar socket was clearly delayed by ionizing radiation at 15 days after tooth extraction but not at 30 days, suggesting that healing is affected more at the intermediate stage than the final stage. In the study by Cohen *et al.* (20), the numerical difference in bone volume fraction between the irradiated group and the control group at 28 days after tooth extraction was lower than the same difference at 21 days after tooth extraction in the study by Tamplen *et al.* (16), although a higher radiation dose was used in the former study. Considering the disparities in the methodologies, this could support the idea that the final healing of the alveolar socket is less influenced by ionizing radiation. Furthermore, the trabecular separation was the only feature of trabecular bone

microarchitecture that remained altered in the GI group at 30 days after tooth extraction, which suggests that the non-mineralized portion of the alveolar socket in irradiated bone is more affected than the mineralized portion.

Bone strength was reduced in the IG group compared with the CG group. According to Nyaruba *et al.* (23) and Wernle *et al.* (24), changes in bone strength seem to be more related to changes in the trabecular morphology than in the cortical morphology of irradiated bone. Nevertheless, the influence of ionizing radiation on the mechanical properties of bone has not yet been fully clarified, and there are conflicting reports in previous studies (13, 23–25). In addition, the micro-CT images (Fig. 2) show changes in the incisor morphology of the animals in the IG group compared with the CG group, possibly due to changes of ionizing radiation in the odontogenic region (26), which may have contributed to the decrease in bone strength in the hemimandibles of the irradiated animals.

In search of reducing bone damage due to irradiation, Rocha *et al.* (9) and Freitas *et al.* (11) observed a radioprotective effect of sodium selenite on bone healing in rat tibia, and Felice *et al.* (13) noted radioprotective effects of amifostine on bone strength in rat mandible. However, in this study as in others (6–8), we chose to evaluate the NSAID meloxicam as a radiation-protective agent. The great advantage of researching the radioprotective effect of NSAIDs is that these drugs are widely studied, even if not for this specific purpose, and their bioavailability, pharmacokinetics and side effects are well known (12). Moreover, it has been suggested that COX-2 inhibition may contribute to control of cancer progression and prevention of metastasis (27, 28). Thus, the administration of NSAIDs could contribute both to mitigate oral complications due to radiotherapy and to aid cancer treatment.

Recently, sodium diclofenac, a classic NSAID, was found to have radioprotective effect on animal survival and on reduction of free radicals and damage to the genetic code of cells after irradiation (12); nevertheless, classic NSAIDs may induce side effects, mainly gastrointestinal effects (8). Furthermore, meloxicam, a COX-2-selective NSAID, has also been shown to have an effective radioprotective effect on animal survival with administration of a single dose before irradiation (7), and on improvement of hematopoiesis with administration of a single dose before irradiation and of multiple doses after irradiation (6, 7). The radioprotective effect on hematopoiesis was not detected only when a single dose of meloxicam was administered after irradiation (8).

Meloxicam did not damage trabecular bone microarchitecture and bone strength, and it significantly improved trabecular separation at 15 days after tooth extraction. Trabecular separation at 30 days after tooth extraction and bone strength were positively influenced by meloxicam. With regard to the clear radioprotective effect observed by Hofer *et al.* (6, 7), the results of the present study fell short of their results, which may be explained by the lower dose of meloxicam used in this study (0.2 mg/kg compared with 20 mg/kg). This choice was made based on our interest in investigating the influence of the clinically established loading dose. However, these results may contribute to the idea that, as mentioned above, the trabecular bone morphology, especially the non-mineralized portion, appears to be more affected by changes in irradiated bone, and therefore more favoured by meloxicam.

Few studies were found on the possible effect of radiation-protective agents on bone healing and bone strength, which compromises comparison and validation of our results. With regard to meloxicam, although the results were not the idealized, in view of the radioprotective effect demonstrated in previous studies and the improvement in trabecular

separation of trabecular bone microarchitecture of healing in the alveolar socket and bone strength in this study, we still believe that meloxicam may be an efficient radiation-protective agent in relation to changes in irradiated bone. Consequently, further studies are required.

CONCLUSION

Applying the proposed methodology, absence of clinical osteoradionecrosis was observed; moreover, based on our results, it was concluded that meloxicam, even though it has not demonstrated a clear radioprotective effect, had a positive effect on the trabecular separation of trabecular bone microarchitecture in alveolar socket healing and the bone strength.

REFERENCES

1. Grimaldi N, Sarmiento V, Provedel L, *et al.* Conduta do cirurgião-dentista na prevenção e tratamento da osteorradionecrose: revisão de literatura. *Rev. Bras. Cancerol.* 2005;51:319–324.
2. Fischer DJ, Epstein JB. Management of patients who have undergone head and neck cancer therapy. *Dent. Clin. North Am.* 2008;52:39–60.
3. Cabrera AR, Yoo DS, Brizel DM. Contemporary radiotherapy in head and neck cancer: balancing chance for cure with risk for complication. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2013;22:579–98.

4. Teng MS, Futran ND. Osteoradionecrosis of the mandible. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2005;13:217–221.
5. Jegoux F, Malard O, Goyenvalle E, *et al.* Radiation effects on bone healing and reconstruction: interpretation of the literature. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2010;109:173–84.
6. Hofer M, Pospíšil M, Znojil V, *et al.* Meloxicam, a cyclooxygenase 2 inhibitor, supports hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice. *Radiat. Res.* 2006;166:556–60.
7. Hofer M, Pospíšil M, Holá J, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase 2 in mice increases production of G-CSF and induces radioprotection. *Radiat. Res.* 2008;170:566–71.
8. Hofer M, Pospíšil M, Dusek L, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 promotes the stimulatory action of adenosine A₃ receptor agonist on hematopoiesis in sublethally γ -irradiated mice. *Biomed. Pharmacother.* 2011;65:427–31.
9. Rocha ASS da, Ramos-Perez FM de M, Bóscolo FN, *et al.* Effect of sodium selenite on bone repair in tibiae of irradiated rats. *Braz. Dent. J.* 2009;20:186–90.
10. Weiss JF, Landauer MR. History and development of radiation-protective agents. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009;85:539–73.
11. Freitas DQ de, Ramos-Perez FM de M, Neves EG, *et al.* Radioprotective effect of sodium selenite on bone repair in the tibia of ovariectomized rats. *Braz. Dent. J.* 2012;23:723–8.
12. Alok A, Adhikari JS, Chaudhury NK. Radioprotective role of clinical drug diclofenac sodium. *Mutat. Res.* 2013;755:156–62.
13. Felice PA, Ahsan S, Perosky JE, *et al.* Prophylactic amifostine preserves the biomechanical properties of irradiated bone in the murine mandible. *Plast. Reconstr. Surg.* 2014;133:314e–21e.

14. Fenner M, Park J, Schulz N, *et al.* Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2010;38:47–53.
15. Boussein ML, Boyd SK, Christiansen BA, *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25:1468–86.
16. Tamplen M, Trapp K, Nishimura I, *et al.* Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 2011;145:404–10.
17. Damek-Poprawa M, Both S, Wright AC, *et al.* Onset of mandible and tibia osteoradionecrosis: a comparative pilot study in the rat. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2013;115:201–11.
18. Niehoff P, Springer IN, Açıllı Y, *et al.* HDR brachytherapy irradiation of the jaw - as a new experimental model of radiogenic bone damage. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2008;36:203–9.
19. Lerouxel E, Moreau a, Bouler JM, *et al.* Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: a new model for evaluation of bone engineering. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2009;47:602–7.
20. Cohen M, Nishimura I, Tamplen M, *et al.* Animal model of radiogenic bone damage to study mandibular osteoradionecrosis. *Am. J. Otolaryngol.* 2011;32:291–300.
21. Liu L, Bassano DA, Prasad SC, *et al.* The linear-quadratic model and fractionated stereotactic radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003;57:827–832.
22. Kurihashi T, Iwata H, Nasu M, *et al.* Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after X-ray irradiation. *Odontology.* 2002;90:35–42.

23. Nyaruba MM, Yamamoto I, Kimura H, *et al.* Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content. *Acta Radiol. (Stockholm, Sweden 1987)*. 1998;39:43–6.
24. Wernle JD, Damron TA, Allen MJ, *et al.* Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model. *J. Biomech.* 2010;43:2738–46.
25. Tchanque-Fossuo CN, Monson LA, Farberg AS, *et al.* Dose-response effect of human equivalent radiation in the murine mandible: Part II. A biomechanical assessment. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011;128:480e–487e.
26. Araujo AMM de, Gomes CC, Almeida SM de, *et al.* Effect of radiotherapy on the eruption rate and morphology of the odontogenic region of rat incisors. *Arch. Oral Biol.* 2014;59:1242–8.
27. Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, *et al.* Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck.* 2002;24:792–9.
28. Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev. Bras. Cancerol.* 2009;55:165–174.

CONCLUSÃO

Ao se aplicar a metodologia proposta, foi observado ausência de osteorradiocrose clínica; além disso, diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o meloxicam, embora não tenha demonstrado evidente efeito radioprotetor, apresentou efeito positivo na separação trabecular média da microestrutura trabecular óssea da reparação alveolar e na resistência óssea.

REFERÊNCIAS*

Alok A, Adhikari JS, Chaudhury NK. Radioprotective role of clinical drug diclofenac sodium. *Mutat Res.* 2013; 755(2): 156-62.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(7): 1468-86.

Cabrera AR, Yoo DS, Brizel DM. Contemporary radiotherapy in head and neck cancer: balancing chance for cure with risk for complication. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013; 22(3): 579-98.

Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cancerol.* 2009; 55(2): 165-74.

Damek-Poprawa M, Both S, Wright AC, Maity A, Akintoye SO. Onset of mandible and tibia osteoradionecrosis: a comparative pilot study in the rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013; 115(2): 201-11.

Felice PA, Ahsan S, Perosky JE, Deshpande SS, Nelson NS, Donneys A, et al. Prophylactic amifostine preserves the biomechanical properties of irradiated bone in the murine mandible. *Plast Reconstr Surg.* 2014; 133(3): 314e-21e.

Fenner M, Park J, Schulz N, Amann K, Grabenbauer GG, Fahrig A, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010; 38(1): 47-53.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Fischer DJ, Epstein JB. Management of patients who have undergone head and neck cancer therapy. *Dent Clin North Am.* 2008; 52(1): 39-60.

Freitas DQ de, Ramos-Perez FM de M, Neves EG, Marques MR, Bóscolo FN, Almeida SM de. Radioprotective effect of sodium selenite on bone repair in the tibia of ovariectomized rats. *Braz Dent J.* 2012; 23(6): 723-8.

Grimaldi N, Sarmiento V, Provedel L, Almeida D de, Cunha S da. Conduta do cirurgião-dentista na prevenção e tratamento da osteorradionecrose: revisão de literatura. *Rev Bras Cancerol.* 2005; 51(4): 319-24.

Hofer M, Pospíšil M, Dusek L, Hoferová Z, Weiterová L. Inhibition of cyclooxygenase-2 promotes the stimulatory action of adenosine A₃ receptor agonist on hematopoiesis in sublethally γ -irradiated mice. *Biomed Pharmacother.* 2011; 65(6): 427-31.

Hofer M, Pospíšil M, Holá J, Vacek A, Streitová D, Znojil V. Inhibition of cyclooxygenase 2 in mice increases production of G-CSF and induces radioprotection. *Radiat Res.* 2008; 170(5): 566-71.

Hofer M, Pospíšil M, Znojil V, Holá J, Vacek A, Weiterová L, et al. Meloxicam, a cyclooxygenase 2 inhibitor, supports hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice. *Radiat Res.* 2006; 166(3): 556-60.

Jegoux F, Malard O, Goyenvalle E, Aguado E, Daculsi G. Radiation effects on bone healing and reconstruction: interpretation of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(2): 173-84.

Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck.* 2002; 24(8): 792-9.

Rocha ASS da, Ramos-Perez FM de M, Bóscolo FN, Manzi FR, Chicarelo M, Almeida SM. Effect of sodium selenite on bone repair in tibiae of irradiated rats. *Braz Dent J.* 2009; 20(3): 186-90.

Teng MS, Futran ND. Osteoradionecrosis of the mandible. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 13(4): 217-21.

Weiss JF, Landauer MR. History and development of radiation-protective agents. *Int J Radiat Biol.* 2009; 85(7): 539-73.

APÊNDICE 1: Material e métodos detalhado

Inicialmente, o projeto deste estudo foi encaminhado para avaliação à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tendo início apenas após a aprovação do mesmo (Anexo 1). Todas as etapas do estudo foram desenvolvidas nas dependências da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP).

SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos heterogênicos (*Rattus norvegicus albinus*) machos da linhagem *Wistar*, procedentes do Biotério Central da UNICAMP, com aproximadamente 75 dias de vida e massa corporal média de 350 gramas. Durante a realização do estudo, os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), o qual apresentava ambiente com temperatura e umidade controladas e ciclo alternado claro-escuro de 12 horas. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum*.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Tendo em vista os procedimentos de administração de meloxicam e exposição à radiação X, os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais (n=10):

- Grupo Controle (GC): sem administração de meloxicam e sem exposição à radiação X;
- Grupo Irradiado (GI): sem administração de meloxicam e com exposição à radiação X;
- Grupo Meloxicam (GM): com administração de meloxicam e sem exposição à radiação X;
- Grupo Meloxicam Irradiado (GMI): com administração de meloxicam e com exposição à radiação X.

Para que todos os animais fossem submetidos aos mesmos estímulos e situações de estresse, todos foram igualmente anestesiados e os animais dos grupos GC e GI receberam aplicação de água destilada ao invés de meloxicam.

PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

Em todos os procedimentos anestésicos realizados durante o estudo, foi utilizada uma solução anestésica preparada com 100 mg/kg de cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) associado a 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (Rompun[®], Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil), que foi administrada, por via intramuscular, na região lateral do membro posterior dos animais. Para a correta determinação da quantidade das substâncias, os animais foram previamente pesados.

ADMINISTRAÇÃO DO MELOXICAM

Aos 75 dias de vida, os animais foram anestesiados de acordo com o procedimento descrito, sendo, em seguida, realizada administração única de meloxicam (Maxicam[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil) na dosagem de 0,2 mg/kg, como indicado pelo fabricante, por via intraperitoneal.

EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO X

Aproximadamente 1 hora após a administração do meloxicam (Hofer et al., 2006, 2008), foi realizado a exposição à radiação X utilizando-se um acelerador linear (Clinic 6/100[®], Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, Estados Unidos), com distância focal de 100 cm e campo de colimação de 15x30 cm. Os animais foram posicionados de modo que apenas a região de cabeça e pescoço ficasse incluída no campo de radiação e a mandíbula ficasse voltada na direção da fonte emissora da radiação ionizante, sendo aplicado dose única de 15 Gy de radiação X (Figura 1).



Figura 1 - Posicionamento dos animais durante a exposição à radiação X.

PROCEDIMENTO DE EXODONTIA

Decorridos 40 dias da exposição à radiação X (Fenner et al., 2010), foi realizado o procedimento de exodontia bilateral dos primeiros molares inferiores dos animais. Para isso, após serem novamente anestesiados conforme o mesmo protocolo, os animais foram posicionados em um suporte para que pudessem manter a abertura bucal, sendo a exodontia realizada apenas com a utilização do instrumento odontológico do tipo hollenback (Duflex[®], S.S. White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 2). Realizou-se, primeiramente, a sindesmotomia, seguida de luxação e avulsão do dente e, por último, sutura, para reduzir o posterior sangramento e acúmulo de alimentos.

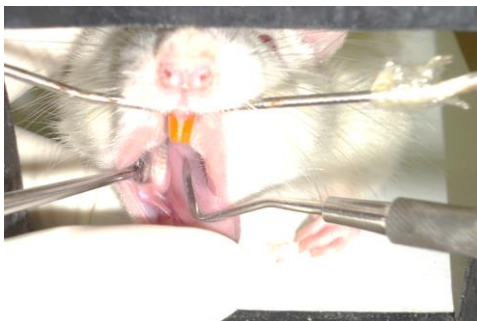


Figura 2 - Posicionamento dos animais para a exodontia.

Visando evitar o desconforto e complicações pós-cirúrgicas, foi realizada, após a exodontia, a administração única, por via intraperitoneal, de 0,1 mg/kg de Pentabiótico[®] Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 0,2 mg/kg de meloxicam (Maxicam[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil), sendo

realizadas duas aplicações adicionais de 0,1 mg/kg de meloxicam, uma 24 horas e outra 48 horas após a exodontia.

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os animais foram mortos, por meio do aprofundamento anestésico com cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), nos tempos de 15 e 30 dias após a exodontia, sendo metade dos animais de cada grupo (n=5) em cada tempo. A região dos primeiros molares inferiores extraídos foi visualmente avaliada em relação à reparação gengival e à presença de fístula. Em seguida, removeu-se as hemimandíbulas dos animais, as quais foram limpas para remoção dos tecidos moles e colocadas em formol tamponado a 10% por 72 horas para a fixação dos tecidos, sendo mantidas em solução salina fisiológica em geladeira até o momento da utilização.

AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ALVEOLAR

Foi selecionada, de cada animal, a hemimandíbula que visualmente não possuía remanescentes radiculares e nem fratura de tábuas ósseas na região do primeiro molar inferior extraído. Além disso, dentro de um mesmo grupo, foram selecionadas as hemimandíbulas que apresentavam processo de reparação alveolar visualmente semelhante.

Para a avaliação da reparação alveolar foi realizada a microtomografia computadorizada (micro-CT) das hemimandíbulas utilizando-se o microtomógrafo e software correspondente SkyScan 1174[®] (SkyScan, Kontich, Bélgica). Inicialmente, cada hemimandíbula foi posicionada verticalmente, com cera utilidade (Lysanda Produtos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil), de forma que a porção posterior ficasse voltada para baixo, em um recipiente com água para evitar a desidratação da mesma durante o escaneamento. O recipiente foi, então, colocado no interior do microtomógrafo sobre o suporte correspondente (Figura 3), sendo, em seguida, obtida uma pré-visualização da imagem para verificação e ajuste da centralização da amostra. Utilizou-se os mesmos parâmetros de exposição para todas as hemimandíbulas, os quais foram: 50 kV, 800 µA,

tamanho do pixel de 9,47 μm , 0,45 graus de rotação, rotação total de 180 graus, *frames* igual a 3 e filtro de alumínio de 0,5 mm. O escaneamento de cada hemimandíbula demorou aproximadamente 2,5 horas, sendo obtidas 407 imagens bases em formato TIFF.

Posteriormente, as imagens bases foram exportadas para o software NRecon[®] (SkyScan, Kontich, Bélgica), no qual foi realizada a reconstrução das mesmas, gerando arquivos no formato BMP. Utilizou-se os mesmos parâmetros de reconstrução para as imagens bases de todas as hemimandíbulas: 700 cortes (iniciando-se da porção distal do segundo molar inferior em direção à região anterior da hemimandíbula), suavização igual a 1, redução de artefatos em anel igual a 5, 10% de correção de *beam-hardening* e histograma com faixa dinâmica de 0,01-0,12.

Já com as imagens reconstruídas, foi utilizado o software DataViewer[®] (SkyScan, Kontich, Bélgica) para ajustar o posicionamento das imagens das hemimandíbulas, de forma que o centro do alvéolo distal do primeiro molar inferior extraído apresentasse na vista sagital o longo eixo paralelo à linha vertical, na vista axial a maior extensão vestibulo-lingual paralela à linha horizontal e na vista transaxial a base óssea paralela à linha horizontal (Figura 4). Em seguida, o conjunto de imagens transaxiais foram salvos, mantendo-se o formato BMP.

O conjunto de imagens transaxiais foi, então, analisado no software CTAn[®] (SkyScan, Kontich, Bélgica) para ser realizada a avaliação da reparação alveolar. Para isso, foram selecionados os cortes que compreendiam o alvéolo distal do primeiro molar inferior extraído, em média 30 cortes, nos quais delimitou-se manualmente a região de interesse, correspondente à área de reparação alveolar (Figura 5). Por fim, foi elaborado uma *Task List* incluindo a seleção do *Threshold* global na faixa de 25-65 e 25-80 para as hemimandíbulas dos animais mortos, respectivamente, nos tempos de 15 e 30 dias após a exodontia, bem como a análise tridimensional do osso trabecular na região da reparação alveolar, a qual revelou parâmetros da microestrutura trabecular óssea, de acordo com Bouxsein et al. (2010), como: volume tecidual total (região de interesse delimitada), volume ósseo (porção mineralizada contida na região de interesse), fração de volume ósseo (volume ósseo/volume tecidual total), número trabecular médio, espessura trabecular média e separação trabecular média.



Figura 3 - Posicionamento da amostra para a micro-CT.

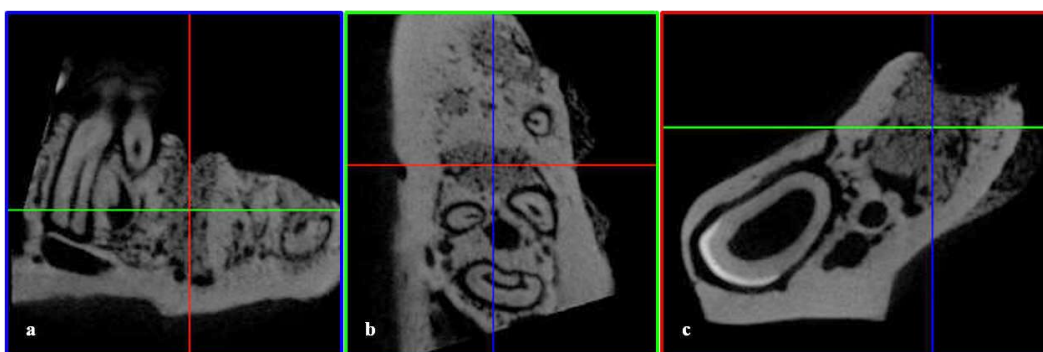


Figura 4 - Posicionamento das imagens do alvéolo distal do primeiro molar inferior. Vista sagital (a); Vista axial (b); Vista transaxial (c).

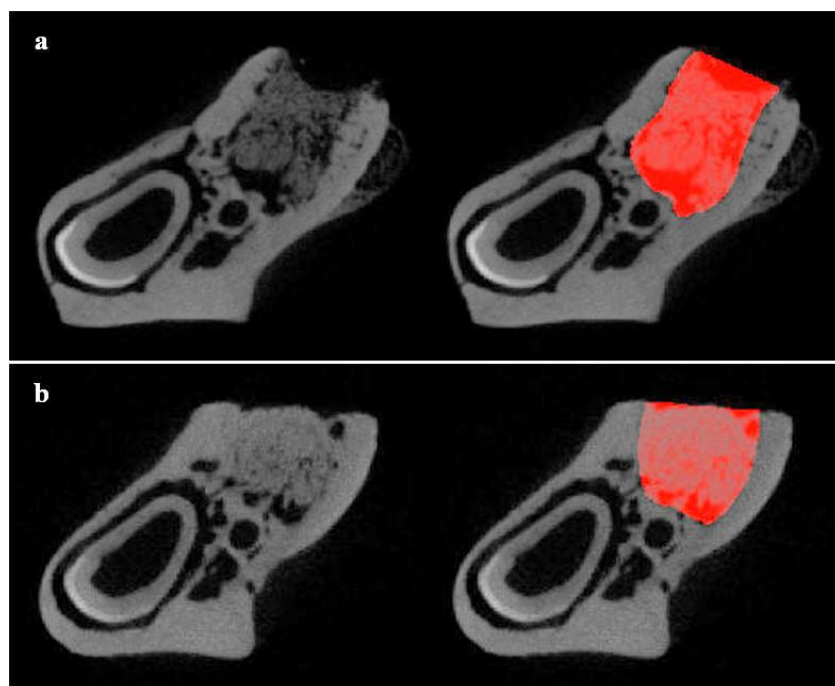


Figura 5 - Área de reparação alveolar do grupo controle aos 15 (a) e 30 (b) dias, sem e com delimitação da região de interesse.

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ÓSSEA

Para a avaliação da resistência óssea, foram utilizadas as hemimandíbulas dos animais não selecionadas para a micro-CT. Empregou-se, para isso, o teste de flexão de três pontos realizado em uma Máquina de Teste Universal Instron 4411[®] (Instron, Norwood, MA, Estados Unidos) com um suporte metálico, possuindo duas barras verticais, paralelas, distantes 20 mm entre si e com a porção superior arredondada, estando esse centralizado e com as barras paralelas em relação ao inserto em forma de bisel da máquina. Cada hemimandíbula foi, em seguida, posicionada com a face lateral apoiada sobre as barras e perpendicularmente às mesmas, de modo que os molares inferiores ficassem na direção do inserto (Figura 6). Foi realizado, então, a aplicação de força por meio da movimentação do inserto na velocidade de 1 mm/min até o momento da fratura da hemimandíbula, obtendo-se o valor da força máxima de resistência óssea, expresso em newton (N), registrado em uma célula de carga máxima de 500 N.

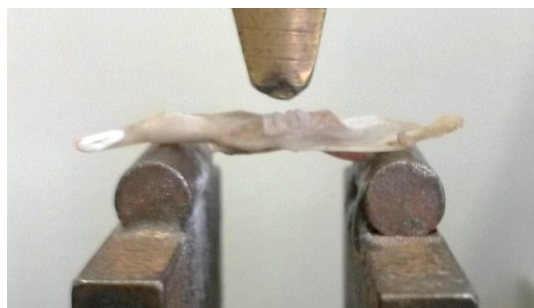


Figura 6 - Posicionamento da amostra para o teste de flexão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos por meio da análise tridimensional na micro-CT e do teste de flexão foram tabulados no software IBM SPSS Statistics 22.0[®] (IBM Corp, Armonk, NY, Estados Unidos), no qual foram realizados cálculos de médias e desvios padrão, bem como o teste de Análise de Variância (ANOVA) um fator, com teste *post hoc* de Tukey, sendo adotado como nível de significância o valor convencional de 5%. Considerou-se como hipótese nula a ausência de diferença estatística significativa entre os grupos experimentais.

APÊNDICE 2: Artigo na versão em português

Avaliação do Meloxicam como Substância Radioprotetora na Osteorradionecrose em Mandíbulas de Ratos Irradiados

Mayra C. Yamasaki, DDS,* Gina D. Roque-Torres, MSc,* Yuri Nejaim, MSc,*
Deborah Q. Freitas, PhD*

*Departamento de Diagnóstico Oral, Área de Radiologia Odontológica,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,
Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Avaliação Meloxicam na Osteorradionecrose

Conflito de interesse: nenhum

Endereço para correspondência:

Mayra Cristina Yamasaki

Av. Limeira, 901, PO Box 52

CEP: 13414-903

Piracicaba-SP, Brasil

Fone/Fax: + 55 19 2106-5327

E-mail: mcyamasaki@uol.com.br

SINOPSE

O presente estudo abrange a hipótese de que o meloxicam poderia reduzir as alterações no osso irradiado, como a osteorradionecrose, uma severa complicação clínica decorrente da radioterapia. Assim, nesta experimentação animal, os ratos foram irradiados e extrações dentárias foram realizadas com o intuito de induzir osteorradionecrose na mandíbula dos mesmos. Além disso, microtomografia computadorizada e teste de flexão foram usados para avaliar a reparação alveolar e a resistência óssea, as quais foram positivamente afetadas pelo meloxicam. A busca pela redução dos danos decorrentes da radioterapia é importante na busca por se melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o possível efeito radioprotetor do anti-inflamatório não esteroide meloxicam na prevenção da osteorradionecrose, na reparação alveolar e na resistência óssea em mandíbulas de ratos irradiados.

Material e Métodos: Quarenta ratos *Wistar* machos foram divididos em 4 grupos ($n=10$): controle (GC), irradiado (GI), meloxicam (GM) e meloxicam irradiado (GMI). Foi administrado dose única de 0,2 mg/kg de meloxicam nos animais dos grupos GM e GMI. Uma hora depois, realizou-se a irradiação dos animais dos grupos GI e GMI com dose única de 15 Gy de radiação X na região de mandíbula. Decorridos 40 dias, foi realizado a exodontia bilateral dos primeiros molares inferiores nos animais, os quais foram mortos após 15 dias ($n=5$) e 30 dias ($n=5$). Utilizou-se a microtomografia computadorizada para avaliação da reparação alveolar, por meio da análise dos parâmetros da microestrutura trabecular óssea; e o teste de flexão para a avaliação da resistência óssea.

Resultados: Aos 15 dias, o volume ósseo, a fração de volume ósseo e a espessura trabecular média foram superiores nos grupos GC e GM comparados aos grupos GI e GMI; já a separação trabecular média teve resultado estatístico inferior no grupo GI em relação aos demais. Aos 30 dias, houve diferença significativa apenas na separação trabecular média, cujo resultado estatístico foi inferior no grupo GI em comparação aos grupos GC e GM. Quanto à resistência óssea, o grupo GI foi inferior em relação aos grupos GC e GM.

Conclusão: Observou-se ausência de osteorradionecrose clínica e o meloxicam, embora não tenha demonstrado evidente efeito radioprotetor, apresentou efeito positivo na separação trabecular média da microestrutura trabecular óssea da reparação alveolar e resistência óssea.

INTRODUÇÃO

A radioterapia é um método locorregional importante e tradicional no tratamento de neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Entretanto, apesar de novos protocolos estarem em contínuo desenvolvimento, invariavelmente haverá algum efeito secundário da radiação ionizante sobre as células sadias, resultando em complicações clínicas imediatas ou tardias. As complicações clínicas imediatas são observadas, geralmente, nos primeiros 90 dias de radioterapia, sendo as mais frequentes: mucosite, dermatite, disgeusia e xerostomia; já as tardias, desenvolvem-se após esse período, sendo as mais frequentes: xerostomia severa, dificuldade na mastigação, deglutição e fala, fibrose, atrofia, trismo e aumento na susceptibilidade a infecções bucais, lesões cariosas e periodontais e osteorradionecrose. A presença de tais complicações apresenta impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, devendo ser consideradas no planejamento, no decorrer e posteriormente à radioterapia (1–3).

A osteorradionecrose é uma das mais severas complicações clínicas decorrentes da radioterapia, sobretudo por apresentar características complexas e tratamento desafiador. Embora muito estudada, a etiopatogenia da mesma ainda não foi completamente elucidada. A teoria mais recente é a da alteração da fisiologia óssea decorrente de um processo de fibroatrofia induzida pela radiação ionizante, de acordo com qual, inicialmente, ocorre um processo inflamatório local crônico não específico sobre os tecidos, promovendo necrose da microvascularização e isquemia local, seguido de um aumento progressivo de tecido fibrótico na região. Assim, é possível observar, no tecido ósseo, fibrose dos espaços medulares e do periósteo, bem como a redução da vascularização, a qual resulta na diminuição do transporte

de nutrientes e de células de defesas. Conseqüentemente, há um aumentando da taxa de morte celular, causando prejuízo da manutenção e da reparação óssea, e, ainda, aumento da susceptibilidade à instalação de infecções no osso (1, 4, 5).

Com o intuito de amenizar as complicações clínicas decorrentes da radioterapia, diversas substâncias radioprotetoras, ou seja, que buscam reduzir os efeitos secundários da radioterapia sobre as células sadias, têm sido amplamente estudadas (6–13). Recentemente, tem-se investigado o possível efeito radioprotetor dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e resultados positivos têm sido observados (6, 7, 12). A radiação ionizante utilizada na radioterapia é capaz de promover a indução de mediadores da inflamação no tecido normal, principalmente, pela ativação da ciclo-oxigenase 2 (Cox-2), podendo promover prejuízos sobre o mesmo (6), assim justificando a investigação dos AINEs como substância radioprotetora.

Diante da severidade e complexidade da osteorradição decorrente da radioterapia de cabeça e pescoço, acredita-se na necessidade da investigação da atuação de possíveis substâncias radioprotetoras no desenvolvimento da mesma. Entretanto, embora a etiopatogenia da osteorradição possa estar relacionada a um processo inflamatório do tecido ósseo induzido pela radiação ionizante, a ação dos AINEs sobre a mesma ainda não foi estudada. Dessa maneira, o presente estudo foi proposto em experimentação animal com o objetivo de avaliar o possível efeito radioprotetor do AINE meloxicam na prevenção da osteorradição, na reparação alveolar e na resistência óssea em mandíbulas de ratos irradiados.

MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação do estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), foram selecionados 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 75 dias de vida e massa corporal média de 350 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas, ciclo alternado claro-escuro de 12 horas e alimentação com ração balanceada padrão e água *ad libitum*.

Os animais foram aleatoriamente divididos, de acordo com os procedimentos de administração de meloxicam e exposição à radiação X, em 4 grupos experimentais ($n=10$): grupo controle (GC), sem administração de meloxicam e sem exposição à radiação X; grupo irradiado (GI), sem administração de meloxicam e com exposição à radiação X; grupo meloxicam (GM), com administração de meloxicam e sem exposição à radiação X; grupo meloxicam irradiado (GMI), com administração de meloxicam e com exposição à radiação X.

Aos 75 dias de vida, os animais foram anestesiados, por via intramuscular, com uma solução de 100 mg/kg de cloridrato de ketamina (Dopalen, Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) associado a 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, realizou-se administração única de meloxicam (Maxicam, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil) na dosagem de 0,2 mg/kg, como indicado pelo fabricante, por via intraperitoneal, nos animais do grupo GM e GMI. Aproximadamente 1 hora depois (6, 7), os animais dos grupos GI e GMI foram expostos à radiação ionizante, sendo aplicado dose única de 15 Gy de radiação X na região de

mandíbula. Além disso, para que todos os animais fossem submetidos aos mesmos estímulos e situações de estresse, todos foram igualmente anestesiados e os animais dos grupos GC e GI receberam aplicação de água destilada ao invés de meloxicam.

Decorridos 40 dias da exposição à radiação X (14), os animais foram novamente anestesiados, conforme o mesmo protocolo, para a realização da exodontia bilateral dos primeiros molares inferiores. Os animais foram, então, mortos nos tempos de 15 e 30 dias após a exodontia, sendo metade dos animais de cada grupo ($n=5$) em cada tempo. A região dos primeiros molares inferiores extraídos foi visualmente avaliada em relação à reparação gengival e à presença de fístula previamente à remoção das hemimandíbulas dos animais, as quais foram colocadas em formol tamponado a 10% por 72 horas e mantidas em solução salina fisiológica em geladeira até o momento da utilização.

Uma hemimandíbula de cada animal foi selecionada para realização da microtomografia computadorizada (micro-CT), por meio da qual foi realizada a avaliação da reparação alveolar. Para isso, cada hemimandíbula foi posicionada verticalmente e de maneira centralizada, em um recipiente com água, no interior do microtomógrafo (SkyScan 1174; SkyScan, Kontich, Bélgica), sendo utilizados os seguintes parâmetros de aquisição das imagens: 50 kV, 800 μ A, tamanho do pixel de 9,47 μ m, 0,45 graus de rotação, rotação total de 180 graus, *frames* igual a 3 e filtro de alumínio de 0,5 mm. As imagens bases obtidas foram, em seguida, reconstruídas no software NRecon (SkyScan, Kontich, Bélgica), selecionando-se os seguintes parâmetros de reconstrução: 700 cortes, suavização igual a 1, redução de artefatos em anel igual a 5, 10% de correção de *beam-hardening* e histograma com faixa dinâmica de 0,01–0,12. Utilizou-se o software DataViewer (SkyScan, Kontich, Bélgica) para ajustar o posicionamento das imagens das hemimandíbulas, de forma a obter

uma melhor visualização do alvéolo distal do primeiro molar inferior extraído. Por fim, o conjunto de imagens foi analisado no software CTAn (SkyScan, Kontich, Bélgica), sendo selecionados apenas os cortes que compreendiam o alvéolo distal do primeiro molar inferior extraído, nos quais delimitou-se manualmente a área de reparação alveolar. Estabeleceu-se o *Threshold* global na faixa de 25–65 e 25–80 para as hemimandíbulas dos animais mortos, respectivamente, nos tempos de 15 e 30 dias após a exodontia. Realizou-se, então, a análise tridimensional da região delimitada para obtenção de parâmetros da microestrutura trabecular óssea, sugeridos por Bouxsein *et al.* (15), como: volume tecidual total, volume ósseo, fração de volume ósseo (volume ósseo/volume tecidual total), número trabecular médio, espessura trabecular média e separação trabecular média.

A outra hemimandíbula de cada animal foi submetida ao teste de flexão de três pontos para a avaliação da resistência óssea. Para isso, cada uma foi posicionada perpendicularmente e com a face lateral apoiada sobre duas barras verticais de um suporte metálico da máquina de teste universal (Instron 4411; Instron, Norwood, MA, Estados Unidos), cujo inserto encontrava-se centralizado em relação às barras e sobre os molares da hemimandíbula (Fig. 1). A aplicação de força foi realizada por meio da movimentação do inserto na velocidade de 1 mm/min até o momento da fratura da hemimandíbula, obtendo-se o valor da força máxima de resistência óssea, expresso em newton (N).

Os dados obtidos por meio da análise tridimensional na micro-CT e do teste de flexão foram tabulados no software IBM SPSS Statistics 22.0[®] (IBM Corp, Armonk, NY, Estados Unidos), no qual foram realizados cálculos de médias e desvios padrão, bem como o teste de Análise de Variância (ANOVA) um fator, com teste *post hoc* de Tukey, sendo

adotado como nível de significância o valor convencional de 5%. Considerou-se como hipótese nula a ausência de diferença estatística significativa entre os grupos experimentais.

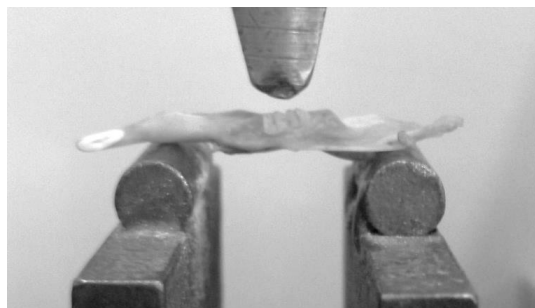


Fig. 1 Posicionamento da amostra para o teste de flexão.

RESULTADOS

A avaliação visual, previamente à remoção das mandíbulas, da região dos primeiros molares inferiores extraídos revelou completa reparação gengival e ausência de fístula em todos os animais.

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados referentes aos parâmetros da microestrutura trabecular óssea da reparação alveolar em cada grupo. Aos 15 dias (Fig. 2), o volume tecidual total ($p=0,308$) e o número trabecular médio ($p=0,060$) não diferiram estatisticamente entre os grupos; o volume ósseo ($p<0,001$), a fração de volume ósseo ($p<0,001$) e a espessura trabecular média ($p<0,001$) foram significativamente superiores nos grupos GC e GM comparados aos grupos GI e GMI; já a separação trabecular média ($p<0,001$) teve resultado estatístico inferior apenas no grupo GI em relação aos demais. Aos 30 dias (Fig. 2), não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao volume tecidual total ($p=0,940$), ao volume ósseo ($p=0,943$), à fração de volume ósseo ($p=0,513$), ao

número trabecular médio ($p=0,204$) e à espessura trabecular média ($p=0,299$); contudo, a separação trabecular média ($p=0,019$) teve resultado estatístico inferior no grupo GI em comparação aos grupos GC e GM, não tendo o grupo GMI diferido estatisticamente dos demais.

TABELA 1 Média e desvio padrão dos dados da microestrutura trabecular óssea, com relação ao volume, de cada grupo

Grupo	Volume Tecidual Total (mm ³)	Volume Ósseo (mm ³)	Fração de Volume Ósseo (%)	
15 Dias	GC	1,96±0,28 A	1,46±0,19 A	75,30±7,69 A
	GI	2,08±0,11 A	0,83±0,17 B	40,01±8,22 B
	GM	1,84±0,22 A	1,40±0,18 A	76,38±5,40 A
	GMI	2,02±0,12 A	0,94±0,16 B	46,98±9,98 B
30 Dias	GC	1,68±0,09 A	1,35±0,13 A	80,01±7,94 A
	GI	1,71±0,25 A	1,30±0,21 A	75,85±5,67 A
	GM	1,59±0,51 A	1,23±0,56 A	75,23±9,74 A
	GMI	1,64±0,30 A	1,34±0,29 A	81,40±6,53 A

Abreviação: GC = grupo controle; GI = grupo irradiado; GM = grupo meloxicam; GMI = grupo meloxicam irradiado. Médias seguidas de letras distintas na vertical apresentam diferença estatística significativa, segundo resultado dos testes ANOVA e Tukey.

TABELA 2 Média e desvio padrão dos dados da microestrutura trabecular óssea, com relação às trabéculas, de cada grupo

Grupo	Número Trabecular Médio (1/mm)	Espessura Trabecular Média (mm)	Separação Trabecular Média (mm)	
15 Dias	GC	3,73±0,22 A	0,20±0,03 A	0,16±0,05 A
	GI	3,70±0,43 A	0,11±0,02 B	0,34±0,04 B
	GM	4,43±0,53 A	0,17±0,03 A	0,16±0,04 A
	GMI	4,22±0,59 A	0,11±0,01 B	0,25±0,06 A
30 Dias	GC	5,28±1,02 A	0,16±0,05 A	0,10±0,02 A
	GI	3,95±1,28 A	0,21±0,05 A	0,22±0,11 B
	GM	4,91±1,30 A	0,17±0,08 A	0,11±0,01 A
	GMI	3,80±1,32 A	0,23±0,06 A	0,14±0,04 AB

Abreviação: GC = grupo controle; GI = grupo irradiado; GM = grupo meloxicam; GMI = grupo meloxicam irradiado. Médias seguidas de letras distintas na vertical apresentam diferença estatística significativa, segundo resultado dos testes ANOVA e Tukey.

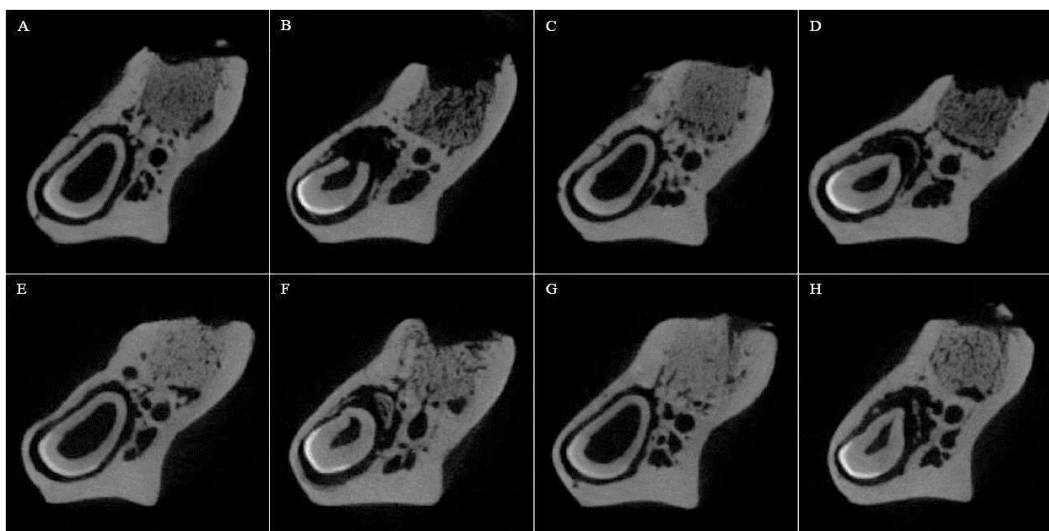


Fig. 2 Área de reparação alveolar aos 15 dias (A–D) e 30 dias (E–H). (A, E) Grupo controle; (B, F) grupo irradiado; (C, G) grupo meloxicam; (D, H) grupo meloxicam irradiado.

Quanto à resistência óssea, os valores obtidos nas hemimandíbulas nos tempos de 15 e 30 dias após a exodontia foram unificados, visto que o intuito foi avaliar a resistência óssea da hemimandíbula como um todo e não apenas na região da reparação alveolar. Os valores do grupo GI foram significativamente inferiores em relação aos dos grupos GC e GM ($p=0,006$), não tendo o grupo GMI diferido estatisticamente dos demais, conforme observado na Tabela 3.

TABELA 3 Média e desvio padrão dos dados da resistência óssea de cada grupo

Grupo	Resistência Óssea (N)
GC	92,71±13,64 A
GI	71,38±10,07 B
GM	91,68±18,32 A
GMI	82,83±13,03 AB

Abreviação: GC = grupo controle; GI = grupo irradiado; GM = grupo meloxicam; GMI = grupo meloxicam irradiado.

Médias seguidas de letras distintas na vertical apresentam diferença estatística significativa, segundo resultado dos testes ANOVA e Tukey.

DISCUSSÃO

A osteorradionecrose é uma importante complicação clínica decorrente da radioterapia de cabeça e pescoço; assim, torna-se fundamental estudá-la, buscando compreender e prevenir a ocorrência da mesma, sendo, para isso, essencial a utilização de experimentação em animais (16, 17). Com esse objetivo, diversos estudos procuraram desenvolver um modelo para induzir a osteorradionecrose em animais (14, 16–20); contudo, nenhum buscou avaliar meios para prevenir o desenvolvimento da mesma. Além disso, ainda que outros estudos tenham sido realizados para investigar a possível ação de substâncias radioprotetoras sobre os efeitos da radiação ionizante (6–9, 11–13), esses buscaram prevenir ou minimizar complicações imediatas da radioterapia, não sendo encontrados estudos relacionados às complicações tardias, como a osteorradionecrose. Conseqüentemente, este estudo pode ser considerado pioneiro na pesquisa por uma substância radioprotetora em relação às modificações prolongadas em tecido ósseo irradiado. Quanto à avaliação por meio da micro-CT, não foram encontrados em estudos prévios valores referentes aos parâmetros da microestrutura trabecular óssea com relação às trabéculas da reparação alveolar de ratos irradiados ou não; dessa maneira, os valores encontrados no presente estudo podem servir de referência para estudos posteriores.

Optou-se, neste estudo, da mesma forma que em outros (14, 19), pela utilização de uma fonte externa de radiação para assemelhar-se mais ao protocolo convencional de radioterapia de cabeça e pescoço. A região de escolha para a irradiação foi a mandíbula, por ser mais susceptível ao desenvolvimento de osteorradionecrose do que os membros posteriores dos animais (17); desse modo, menores doses de radiação tiveram que ser

utilizadas, uma vez que a região de cabeça e pescoço possui tecidos mais radiosensíveis e uma alta dose de radiação poderia provocar a morte prematura dos animais (19). Em relação ao protocolo de irradiação fracionada, embora seja preconizado na radioterapia de cabeça e pescoço, é de complexa execução em experimentação animal, exigindo múltiplas irradiações e repetidas anestésias, condições indesejáveis tanto pela menor reprodutibilidade do estudo quanto pela menor probabilidade de sobrevivência dos animais (5, 16, 18).

Assim, uma dose única de 15 Gy de radiação X foi utilizada no presente estudo. De acordo com a equação do modelo linear-quadrático (21) e assumindo a razão α/β , empregado para quantificar a radiosensibilidade do tecido, para o osso igual a 2 (14), uma dose única de 15 Gy é equivalente à uma dose total aproximada de 64 Gy com frações de 2 Gy, as quais são utilizadas em um protocolo convencional de radioterapia de cabeça e pescoço. Além disso, a dose total de 64 Gy é compatível com a dose de radiação mínima (60 Gy) necessária para possibilitar o desenvolvimento da osteorradionecrose (1, 2, 4, 14).

Procurando induzir a osteorradionecrose, realizou-se, ainda, exodontias nos animais, semelhantemente a outros estudos (16, 20, 22). Entretanto, a fim de simular as circunstâncias em que um paciente necessita realizar uma exodontia decorrido certo tempo após a radioterapia, por ser contraindicada no período de tratamento, optou-se por realizá-las mais tardiamente, 40 dias após a irradiação dos animais, visto que esse período é suficiente para proporcionar alterações histológicas do tecido ósseo em mandíbulas de ratos irradiados (14).

Todavia, apesar de ter sido empregada uma dose de radiação semelhante a 60 Gy fracionada e de se ter realizado exodontias na mandíbula irradiada, observou-se, no presente estudo, completa reparação gengival e ausência de fístula na região das exodontias em todos

os animais. Fenner *et al.* (14) e Lerouxel *et al.* (19) também não conseguiram induzir osteorradiocrose clínica; contudo, notaram alterações histológicas do tecido ósseo similares às características histológicas da osteorradiocrose. Sendo assim, pode-se inferir que a ausência de um quadro clínico de osteorradiocrose não indica que o tecido ósseo não tenha sido modificado pela radiação ionizante, condição que pôde ser demonstrada neste estudo pelo atraso da reparação alveolar aos 15 dias e pela menor resistência óssea apresentada no grupo GI quando comparadas às do grupo GC.

O volume tecidual total avaliado foi semelhante em todos os grupos, demonstrando que a área de reparação alveolar delimitada para análise tridimensional na micro-CT foi, conforme idealizado, equivalente nos mesmos. Observou-se, ainda, que a radiação ionizante proporcionou um evidente atraso da reparação alveolar aos 15 dias, porém não aos 30 dias, sugerindo que a mesma influencia mais o estágio intermediário do que o estágio final da reparação alveolar. No estudo de Cohen *et al.* (20), a diferença numérica entre a fração de volume ósseo do grupo irradiado e do grupo controle na reparação alveolar aos 28 dias foi menor do que a mesma diferença na reparação alveolar aos 21 dias no estudo de Tamplen *et al.* (16), apesar do primeiro ter utilizado maior dose de radiação; essa observação, poderia, ponderando-se as divergências nas metodologias, suportar a ideia de que o estágio final da reparação alveolar é menos influenciado pela radiação ionizante. Além disso, a separação trabecular média foi o único parâmetro da microestrutura trabecular óssea que se manteve alterado no GI aos 30 dias, sugerindo que a porção não mineralizada da reparação alveolar é mais afetada no osso irradiado do que a porção mineralizada.

Com relação à resistência óssea, houve uma redução da mesma no grupo GI quando comparado ao grupo GC. Como sugerido por Nyaruba *et al.* (23) e Wernle *et al.* (24),

a alteração da resistência óssea parece estar mais relacionada às modificações sobre a morfologia trabecular do que sobre a cortical do osso irradiado. No entanto, a influência da radiação ionizante quanto às propriedades mecânicas do osso ainda não foi completamente elucidada, havendo divergências entre estudos anteriores (13, 23–25). Além disso, a partir das imagens da micro-CT (Fig. 2), foi possível observar uma alteração da morfologia do incisivo dos animais do grupo GI em relação aos do grupo GC, possivelmente em decorrência das modificações desencadeadas pela radiação ionizante sobre a região odontogênica do mesmo (26), condição que pode ter contribuído para redução da resistência óssea das hemimandíbulas dos animais irradiados.

Frente à observação dos efeitos deletérios da irradiação sobre o osso e buscando reduzi-los, Rocha *et al.* (9) e Freitas *et al.* (11) constataram efeito radioprotetor do selenito de sódio sobre a reparação óssea em tibia de ratos; já Felice *et al.* (13) notaram efeito radioprotetor da amifostina sobre a resistência óssea em mandíbula de ratos. Entretanto, optou-se, neste estudo, do mesmo modo que em outros (6–8), pela avaliação do AINE meloxicam como possível substância radioprotetora. A grande vantagem da investigação do possível efeito radioprotetor dos AINEs é que os mesmos são substâncias que já foram amplamente estudadas, ainda que não para esse fim específico, sendo as características farmacológicas e reações adversas muito conhecidas (12). Além disso, tem-se sugerido que a inibição da Cox-2 pode contribuir para o controle da progressão das neoplasias malignas e para a prevenção de metástases (27, 28). Dessa maneira, a utilização dos AINEs contribuiria tanto para amenizar as complicações clínicas da radioterapia quanto para auxiliar no tratamento das neoplasias malignas.

Recentemente, verificou-se efeito radioprotetor do diclofenaco de sódio, um AINE convencional, em relação à sobrevida dos animais e à redução dos radicais livres e dos danos sobre o material genético das células após a irradiação (12); no entanto, os AINEs convencionais podem apresentar reações adversas, principalmente sobre o sistema gastrointestinal (8). Além disso, o meloxicam, AINE seletivo da Cox-2, também tem demonstrado eficaz efeito radioprotetor quanto à sobrevida dos animais, após única administração antes da irradiação (7), e à melhora sobre a hematopoiese, tanto após única administração antes da irradiação quanto após múltipla administração posteriormente à irradiação (6, 7). Apenas quando o meloxicam foi administrado em dose única depois da irradiação é que o efeito radioprotetor não foi detectado na hematopoiese (8).

Observou-se que o meloxicam não proporcionou prejuízo dos parâmetros da microestrutura trabecular e da resistência óssea, exibindo melhora significativa somente em relação à separação trabecular média aos 15 dias de reparação alveolar; já com relação à separação trabecular média aos 30 dias e à resistência óssea, essas foram positivamente influenciadas pelo meloxicam. Em relação ao evidente efeito radioprotetor encontrado por Hofer *et al.* (6, 7), os resultados do presente estudo ficaram aquém do mesmo, fato que pode ser explicado pela menor dose de meloxicam preconizada por este estudo (0,2 mg/kg) em comparação aos demais (20 mg/kg). Entretanto, essa escolha foi baseada no interesse de se investigar a ação da dose clínica de ataque convencionalmente estabelecida e preconizada. Mesmo que discretos, os resultados obtidos podem contribuir para a ideia de que, como mencionado anteriormente, a morfologia trabecular óssea, com destaque para porção não mineralizada, parece estar mais relacionada às modificações do osso irradiado, sendo, portanto, mais favorecida pela ação do meloxicam.

Diante do exposto, ressalta-se que, embora diversos estudos tenham sido desenvolvidos, escassos estudos foram encontrados sobre a possível ação de substâncias radioprotetoras na reparação e na resistência óssea, o que prejudica a comparação para validação dos resultados obtidos. Quanto ao meloxicam, apesar dos resultados não terem sido o idealizado, tendo em vista o efeito radioprotetor demonstrado em estudos prévios associado à melhoria na separação trabecular média da microestrutura trabecular óssea da reparação alveolar e na resistência óssea neste estudo, ainda acredita-se que esse possa ser uma possível e eficiente substância radioprotetora em relação às alterações no osso irradiado, conseqüentemente, nota-se a necessidade da realização de estudos adicionais.

CONCLUSÃO

Ao se aplicar a metodologia proposta, foi observado ausência de osteorradionecrose clínica; além disso, diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o meloxicam, embora não tenha demonstrado evidente efeito radioprotetor, apresentou efeito positivo na separação trabecular média da microestrutura trabecular óssea da reparação alveolar e na resistência óssea.

REFERÊNCIAS

1. Grimaldi N, Sarmento V, Provedel L, *et al.* Conduta do cirurgião-dentista na prevenção e tratamento da osteorradionecrose: revisão de literatura. *Rev. Bras. Cancerol.* 2005;51:319–324.

2. Fischer DJ, Epstein JB. Management of patients who have undergone head and neck cancer therapy. *Dent. Clin. North Am.* 2008;52:39–60.
3. Cabrera AR, Yoo DS, Brizel DM. Contemporary radiotherapy in head and neck cancer: balancing chance for cure with risk for complication. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2013;22:579–98.
4. Teng MS, Futran ND. Osteoradionecrosis of the mandible. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2005;13:217–221.
5. Jegoux F, Malard O, Goyenvalle E, *et al.* Radiation effects on bone healing and reconstruction: interpretation of the literature. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2010;109:173–84.
6. Hofer M, Pospíšil M, Znojil V, *et al.* Meloxicam, a cyclooxygenase 2 inhibitor, supports hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice. *Radiat. Res.* 2006;166:556–60.
7. Hofer M, Pospíšil M, Holá J, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase 2 in mice increases production of G-CSF and induces radioprotection. *Radiat. Res.* 2008;170:566–71.
8. Hofer M, Pospíšil M, Dusek L, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 promotes the stimulatory action of adenosine A₃ receptor agonist on hematopoiesis in sublethally γ -irradiated mice. *Biomed. Pharmacother.* 2011;65:427–31.
9. Rocha ASS da, Ramos-Perez FM de M, Bóscolo FN, *et al.* Effect of sodium selenite on bone repair in tibiae of irradiated rats. *Braz. Dent. J.* 2009;20:186–90.
10. Weiss JF, Landauer MR. History and development of radiation-protective agents. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009;85:539–73.
11. Freitas DQ de, Ramos-Perez FM de M, Neves EG, *et al.* Radioprotective effect of sodium selenite on bone repair in the tibia of ovariectomized rats. *Braz. Dent. J.* 2012;23:723–8.

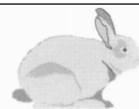
12. Alok A, Adhikari JS, Chaudhury NK. Radioprotective role of clinical drug diclofenac sodium. *Mutat. Res.* 2013;755:156–62.
13. Felice PA, Ahsan S, Perosky JE, *et al.* Prophylactic amifostine preserves the biomechanical properties of irradiated bone in the murine mandible. *Plast. Reconstr. Surg.* 2014;133:314e–21e.
14. Fenner M, Park J, Schulz N, *et al.* Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2010;38:47–53.
15. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25:1468–86.
16. Tamplen M, Trapp K, Nishimura I, *et al.* Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 2011;145:404–10.
17. Damek-Poprawa M, Both S, Wright AC, *et al.* Onset of mandible and tibia osteoradionecrosis: a comparative pilot study in the rat. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2013;115:201–11.
18. Niehoff P, Springer IN, Açil Y, *et al.* HDR brachytherapy irradiation of the jaw - as a new experimental model of radiogenic bone damage. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2008;36:203–9.
19. Lerouxel E, Moreau a, Bouler JM, *et al.* Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: a new model for evaluation of bone engineering. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2009;47:602–7.
20. Cohen M, Nishimura I, Tamplen M, *et al.* Animal model of radiogenic bone damage to study mandibular osteoradionecrosis. *Am. J. Otolaryngol.* 2011;32:291–300.

21. Liu L, Bassano DA, Prasad SC, *et al.* The linear-quadratic model and fractionated stereotactic radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003;57:827–832.
22. Kurihashi T, Iwata H, Nasu M, *et al.* Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after X-ray irradiation. *Odontology.* 2002;90:35–42.
23. Nyaruba MM, Yamamoto I, Kimura H, *et al.* Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content. *Acta Radiol. (Stockholm, Sweden 1987).* 1998;39:43–6.
24. Wernle JD, Damron TA, Allen MJ, *et al.* Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model. *J. Biomech.* 2010;43:2738–46.
25. Tchanque-Fossuo CN, Monson LA, Farberg AS, *et al.* Dose-response effect of human equivalent radiation in the murine mandible: Part II. A biomechanical assessment. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011;128:480e–487e.
26. Araujo AMM de, Gomes CC, Almeida SM de, *et al.* Effect of radiotherapy on the eruption rate and morphology of the odontogenic region of rat incisors. *Arch. Oral Biol.* 2014;59:1242–8.
27. Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, *et al.* Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck.* 2002;24:792–9.
28. Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev. Bras. Cancerol.* 2009;55:165–174.

ANEXO 1: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COMO RADIOPROTETORAS NO DESENVOLVIMENTO DE OSTEORADIONECROSE EM RATOS" (protocolo nº 3048-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Deborah Queiroz De Freitas França / MAYRA CRISTINA YAMASAKI, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 03 de junho de 2013.

Campinas, 03 de junho de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva


CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

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

ANEXO 2: Comprovação de submissão do artigo

 **Submission confirmation**

De: redjournal@astro.org 

Para: mcyamasaki@uol.com.br 

Cópia:

Cópia oculta:

Assunto: Submission confirmation

Data: 09/02/2015 19:02

Dear Ms. Yamasaki,

Your manuscript entitled "Evaluation of Meloxicam as a Radiation-Protective Agent on Mandibular Osteonecrosis in Irradiated Rats" has been received by the online Elsevier Editorial System of the International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.

It will be sent out for review, and as soon as a decision is reached regarding its suitability for publication in the journal, you will be notified.

Your manuscript will be given a manuscript number once an Editor has been assigned. If you have any questions, please use this number in your inquiry.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/rob/>.

Thank you for your interest in the International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.

Sincerely,

Anthony L. Zietman, MD

Editor-in-Chief

ANEXO 3: Declaração de não infração de direito autoral



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



DECLARAÇÃO

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado intitulada “AVALIAÇÃO DO MELOXICAM COMO SUBSTÂNCIA RADIOPROTETORA EM MANDÍBULAS DE RATOS IRRADIADOS”, não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Piracicaba, 20 de Março de 2015.

Mayra Cristina Yamasaki
MAYRA CRISTINA YAMASAKI
RG: 44338279-7
Autor(a)

Deborah Queiroz de Freitas
DEBORAH QUEIROZ DE FREITAS FRANÇA
RG: 27696335-0
Orientador(a)