



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus São José dos Campos

**BRENO CHERFÊN PEIXOTO**

**EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIOTERAPIA NA EXPRESSÃO DO  
FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGF) DURANTE A  
ODONTOGÊNESE EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)**



**2009**

**BRENO CHERFÊN PEIXOTO**

**EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIOTERAPIA NA EXPRESSÃO DO  
FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGF) DURANTE A  
ODONTOGÊNESE EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, Área Radiologia Odontológica.

Orientador: Prof. Titular Luiz Cesar de Moraes

São José dos Campos

2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos  
Campos: FOSJC/UNESP; 2008.

P359e Peixoto, Breno Cherfên.  
Efeitos biológicos da radioterapia na expressão do fator de crescimento  
epidérmico (EGF) durante a odontogênese em camundongos (*Mus musculus*) /  
Breno Cherfên Peixoto. \_\_ São José dos Campos : [s.n.], 2009.  
89.f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Radiologia) – Faculdade de  
Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar de Moraes

1. Radiobiologia . 2. Radioterapia. 3. Radiação Ionizante. 4. Odontogênese.  
5. Fatores de crescimento 6. EGF. 7. Imuno-histoquímica I. Moraes, Luiz Cesar  
de. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José  
dos Campos. III. Título

tD682

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por  
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 6 de Julho de 2009 .

Assinatura:

E-mail: peixotobc2@hotmail.com

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Professor Titular Luiz Cesar de Moraes (Orientador)**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

### **Professor Doutor Miguel Angel Castillo Salgado**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

### **Professora Titular Yasmin Rodarte Carvalho**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

### **Professor Doutor João Luiz de Miranda**

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM

### **Professora Titular Marlene Fenyo Soeiro de Matos Pereira**

Faculdade de Odontologia da USP  
Universidade de São Paulo – USP

São José dos campos, 06 de Julho de 2009.

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Lídice**, sempre carinhosa e grande responsável pela minha formação moral e intelectual.

Aos meus irmãos, **Bruno e Giovanna**, assim como minhas queridas sobrinhas **Isabela e Sara** e meu cunhado **José Maria**.

À família **Cherfên**, que não é pequena...

## **AGRADECIMENTOS**

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, Campus de São José dos Campos, na pessoa de seu Diretor, **Professor Doutor José Roberto Rodrigues**, pelo apoio incondicional.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior) pela bolsa de estudo, e à **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro ao Projeto de Pesquisa.

Ao **IEAv** (Instituto de Estudos Avançados), órgão do **CTA** (Comando-geral de Tecnologia Aeroespacial) de São José dos Campos e seus profissionais, os **Físicos Odair Lelis Gonçalves, Claudio Antonio Federico e Wagner Aguiar de Oliveira**.

À clínica **CENON**, principal colaboradora deste projeto, devido ao intenso intercâmbio com seus profissionais, **Doutor Carlos de Oliveira** e o **Físico-Médico Wagner Gonçalves Maia**.

À **Professora Doutora Rita Sinigaglia Coimbra**, do Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental da **UNIFESP** (Universidade Federal de São Paulo), por nos ajudar a desvendar e compreender os complexos mecanismos da técnica imuno-histoquímica.

Ao **CEBAPE** (Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com Necessidades Especiais - FOSJC/UNESP), especialmente à **Professora Adjunta Mônica Fernandes Gomes** pela confiança e carinho, e à **Professora Doutora Maria das Graças Vilela Goulart**, por todo o aprendizado e por me ensinar a ser uma pessoa melhor.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, especialmente à **Professora Adjunta Rosilene Fernandes da Rocha** e à **Professora Adjunta Cristiane Yumi koga Ito**, por sempre defenderem os interesses dos alunos.

Ao **Professor Assistente Ivan Balducci**, pela orientação na análise estatística.

Aos queridos **colegas de Pós-Graduação**, veteranos e recém-chegados, em especial à turma do truco (Bridge?) e aos colegas **Rafaela Rangel Rosa, Michelle Bianchi de Moraes, Simone Maria Ragoni Guimarães e Roberto Hiroshi Matsui**. Companheiros que tanto ajudaram na minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos do CEBAPE **Neia Oliveira, Massao Imai e Walter Cruz**, colaboradores fundamentais durante toda a fase experimental.

À **Sílvia Scarpel**, pela atenciosa colaboração.

À **Silvana Alvarez, Sônia Maria Reis, Ana Paula Matozo Durante** e toda a competente equipe da **Biblioteca**.

Às secretárias da Pós-Graduação, **Rose, Erena, Cidinha e LÍlian**, sempre acessíveis a todas nossas solicitações.

Aos amigos **Lourival, Toninho, Seu Félix, Marcos, Conceição, Eliana, Newton, André, Luciano, Messias, Fátima, Cláudia** e todos os funcionários da FOSJC/UNESP, tão profissionais e prontos a nos ajudarem.

A **Deus**, pelo dom da vida.

Ao meu Orientador,

**Professor Titular Luiz Cesar de Moraes**, por ser exatamente aquilo que um aluno espera de seu Mestre.

Ao **Professor Assistente Doutor Miguel Angel Castillo Salgado**, por compartilhar todo o seu conhecimento, sempre com humildade e cordialidade.

“Um **Pesquisador** não pode conviver com uma verdade nos lábios e outra no coração. (...) Sem liberdade não há verdade e nem virtude”.

**(Fritz Müller)**

	<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
	<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS.....</b>	<b>11</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>13</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>14</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Radiobiologia.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Efeitos da radiação sobre os tecidos bucais.....</b>	<b>19</b>
2.2.1	Mucosa bucal.....	19
2.2.2	Papilas gustativas.....	20
2.2.3	Glândulas salivares.....	20
<b>2.3</b>	<b>Fases da odontogênese.....</b>	<b>21</b>
2.3.1	Formação da banda epitelial primária.....	21
2.3.2	Fase de botão.....	22
2.3.3	Fase de capuz.....	23
2.3.4	Fase de campânula.....	24
2.3.5	Fase de coroa.....	25
2.3.6	Fase de raiz.....	26
<b>2.4</b>	<b>Histórico e propriedades físicas e químicas do EGF.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>Aspectos da radiobiologia relacionada à odontogênese....</b>	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Aspectos da biologia molecular relacionada à odontogênese.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7</b>	<b>Aspectos da Radiobiologia relacionada à biologia molecular.....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>46</b>

<b>4.2</b>	<b>Dosimetria</b> .....	47
<b>4.3</b>	<b>Técnica de radioterapia</b> .....	48
<b>4.4</b>	<b>Cesariana e preparo dos embriões para histologia</b> .....	50
<b>4.5</b>	<b>Imuno-histoquímica</b> .....	50
4.5.1	Processamento das peças histológicas para reações de imuno-histoquímica.....	50
4.5.2	Técnica de imuno-histoquímica.....	51
<b>4.6</b>	<b>Análise imuno-histoquímica</b> .....	52
4.6.1	Leitura das lâminas.....	52
4.6.2	Análise Histomorfométrica.....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	55
<b>5.1</b>	<b>Análise Histológica</b> .....	55
5.1.1	14º dia pré-natal.....	56
5.1.1.1	Grupo Controle.....	56
5.1.1.2	Grupo 3 Gy.....	58
5.1.2	16º dia pré-natal.....	59
5.1.2.1	Grupo controle.....	59
5.1.2.2	Grupo 3 Gy.....	61
5.1.3	18º dia pré-natal.....	62
5.1.3.1	Grupo controle.....	62
5.1.3.2	Grupo 3 Gy.....	64
<b>5.2</b>	<b>Análise Histomorfométrica</b> .....	65
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	73
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS*</b> .....	74
<b>ANEXOS</b> .....		82
<b>ABSTRACT</b> .....		89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Seqüência de aminoácidos do TGF-1 ou TGF- $\alpha$ (A).	31
	Modelo do receptor para TGF- $\alpha$ como proteína transmembrana (B).....	31
Figura 2 –	Interações biomoleculares relacionadas à erupção...	41
Figura 3 –	Pastilhas TLD fornecidas pelo Laboratório de Dosimetria Termoluminescente do Instituto de Estudos Avançados do CTA (A).....	49
	Animal a ser irradiado sob varias camadas de bólus e dosímetros (B).....	49
	Animal em posição de irradiação (C).....	49
	Medida da dose absorvida (D).....	49
	Câmara Farmer (E).....	49
	Irradiação da câmara Farmer (F).....	49
Figura 4 –	Fotomicrografia de germe dentário em fase de capuz indicando campos histológicos para a histomorfometria (A).....	54
	Fotomicrografia mostrando interação das células epiteliais periféricas do órgão do esmalte imunopositivas para EGF, que interagem com as células do ectomesênquima do germe dentário (B)...	54
Figura 5 –	Fotomicrografia do Controle positivo (glândula salivar submandibular de camundongo adulto).....	56
Figura 6 –	Fotomicrografia do germe dentário na fase de botão mostrando a expressão moderada do EGF no órgão do esmalte e fraca no ectomesênquima.....	57

Figura 7 –	Fotomicrografia do germe dentário na fase de botão mostrando a expressão moderada de EGF no epitélio e fraca no ectomesênquima (A).....	58
	Fotomicrografia do germe dentário na fase de banda epitelial primária mostrando a expressão fraca de EGF no epitélio e fraca no ectomesênquima (B).....	58
Figura 8 –	Fotomicrografia do germe dentário na fase de capuz mostrando a expressão fraca de EGF no epitélio e no ectomesênquima (A).....	60
	Detalhe da curvatura cervical expressando EGF de forma moderada (B).....	60
Figura 9 –	Fotomicrografia da área do germe dentário com degeneração celular e expressão moderada de EGF no epitélio e no ectomesênquima (A).....	61
	Fotomicrografia do germe dentário na fase de botão (B).....	61
	Fotomicrografia do germe dentário na fase de capuz mostrando a expressão fraca de EGF no epitélio e no ectomesênquima (C); (D).....	61
Figura 10 –	Fotomicrografia do germe dentário na fase de campânula mostrando a expressão fraca de EGF no epitélio e no ectomesênquima (A); (B).....	63
Figura 11 –	Fotomicrografia do germe dentário do grupo 3Gy na fase de campânula (A); (B).....	64
	Fotomicrografia do germe dentário na fase de capuz (C).....	64
	Fotomicrografia do germe dentário apresentando degeneração (D).....	64
Figura 12 –	Representação gráfica da análise histomorfométrica	66

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 –	Escore padrão para imuno-histoquímica.....	53
Quadro 2 –	Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo controle (14 <sup>o</sup> dia pré-natal).....	57
Quadro 3 –	Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo 3 Gy (14 <sup>o</sup> dia pré-natal).....	59
Quadro 4 –	Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo controle (16 <sup>o</sup> dia pré-natal).....	60
Quadro 5 –	Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo 3 Gy (16 <sup>o</sup> dia pré-natal).....	62
Quadro 6 –	Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo controle (18 <sup>o</sup> dia pré-natal).....	63
Quadro 7 –	Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo 3 Gy (18 <sup>o</sup> dia pré-natal).....	65
Tabela 1 –	Distribuição em frequência absoluta e relativa da ocorrência de mortalidade nos embriões do 14 <sup>o</sup> , 16 <sup>o</sup> e 18 <sup>o</sup> dias pré-natais. Comparação das proporções de vivos e, cada período (teste z da curva normal).....	55
Tabela 2 –	Estatística descritiva e resultado do teste de Mann-Whitney na comparação dos grupos segundo os três períodos.....	66
Tabela 3 –	Análise histomorfométrica - 14 <sup>o</sup> dia pré-natal - Grupos Controle e 3 Gy.....	84
Tabela 4 –	Análise histomorfométrica - 16 <sup>o</sup> dia pré-natal - Grupos Controle e 3 Gy.....	85
Tabela 5 –	Análise histomorfométrica - 18 <sup>o</sup> dia pré-natal - Grupos Controle e 3 Gy.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CSF-1 =	fator de estimulação de colônia de macrófagos 1
DAB =	Diaminobenzidina
Da =	Dalton, Unidade de massa atômica
DNA =	Ácido desoxirribonucléico
EGF =	Fator de crescimento epidérmico
EGFR =	Receptor para o fator de crescimento epidérmico
Gy =	Gray - moderna unidade de medida para dose absorvida
hEGF =	Fator de crescimento epidérmico humano
IFN- $\alpha$ =	Interferon $\alpha$
IL-1 =	Interleucina 1
IL-6 =	Interleucina 6
kDa =	Quilodaltos
MCP-1 =	Proteína quimiotática para monócitos 1
mEGF =	Fator de crescimento epidérmico de camundongos
mRNA =	Ácido ribonucléico mensageiro
pH =	Potencial Hidrogeniônico
PTHrP =	Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide
Rad =	Antiga unidade de medida para dose absorvida
SAR =	Síndrome aguda de radiação
TGF- $\alpha$ =	Fator de crescimento transformante $\alpha$
TGF- $\beta$ =	Fator de crescimento transformante $\beta$
TLD =	Dosímetros termoluminescentes de sulfato de cálcio
TNF- $\alpha$ =	Fator de necrose tumoral $\alpha$
VEGF =	Fator de crescimento vasoendotelial

Peixoto BC. Efeitos biológicos da radioterapia na expressão do fator de crescimento epidérmico (EGF) durante a odontogênese em camundongos (*Mus musculus*) [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2009.

## RESUMO

Pacientes portadores de câncer na região de cabeça e pescoço quando submetidos à radioterapia podem apresentar vários tipos de manifestações clínicas, dentre elas a diminuição dos níveis salivares do fator de crescimento epidérmico (EGF). O EGF é uma pequena proteína (53 aminoácidos) que estimula a proliferação de células dos mamíferos, sendo encontrada em vários órgãos em desenvolvimento. Pode também exercer um papel fisiológico na erupção dentária ao interagir com outras moléculas como o fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a interleucina 1 (IL-1) e do fator de estimulação de colônia 1 (CSF-1), aumentando a reabsorção óssea e estimulando a quimiotaxia de células mononucleares. O objetivo deste trabalho foi verificar, por meio de reações de imuno-histoquímica, se a expressão do fator de crescimento epidérmico (EGF) pode ser alterada na odontogênese do primeiro molar superior de camundongos *Mus musculus*, após exposição de fêmeas prenhes a radioterapia, na dose de 3 Gray (Gy) ao décimo dia de gestação. Foram avaliados os germes dentários dos embriões aos 14, 16 e 18 dias de desenvolvimento pré-natal. As análises morfológica microscópica óptica e histomorfométrica demonstraram que o número de células epiteliais periféricas do órgão do esmalte imunopositivas para o EGF foi significativamente menor no grupo 3 Gy em relação ao grupo controle nos períodos de 14<sup>o</sup> ( $P < 0,0001$ ), 16<sup>o</sup> ( $P < 0,0001 < 0,05$ ) e 18<sup>o</sup> ( $P < 0,0008$ ) dias pré-natais. Processo FAPESP n<sup>o</sup> 2008/54534-8.

Palavras-chave: Radiobiologia. Radioterapia. Radiação ionizante. Odontogênese. Fatores de crescimento. EGF. Imuno-histoquímica.

## 1 INTRODUÇÃO

Considerada uma das maiores conquistas científicas de todos os tempos, a descoberta dos raios X por Wilhelm Conrad Roentgen em 1895 causou grande impacto no meio científico. Pesquisadores de várias universidades que já se dedicavam aos estudos dos raios catódicos se interessavam cada vez mais sobre radiações ionizantes, mas ainda não tinham conhecimento do seu caráter cumulativo quanto aos danos nas células e dos efeitos biológicos indesejados que poderiam causar.

Atualmente, vários procedimentos preventivos, equipamentos modernos e películas radiográficas cada vez mais sensíveis permitem que a Radiologia Odontológica ocupe seu papel fundamental no diagnóstico sem causar danos aos pacientes. Entretanto, pacientes portadores de lesões malignas na região de cabeça e pescoço necessitam de altas doses de radiação ionizante, devido ao fato das células malignas serem mais sensíveis aos efeitos das radiações que as células saudáveis.

Do ponto de vista físico, as radiações podem ser classificadas como: corpusculares (apresentam massa), e eletromagnéticas (campos elétrico e magnético, que formam entre si um ângulo de  $90^\circ$ , à velocidade da luz).

Do ponto de vista biológico as radiações podem ser divididas em: não-ionizantes (não suficiente para realizar ionização dos átomos), e ionizantes (provoca ejeção de elétrons das órbitas dos átomos).

Como consequência, efeitos biológicos indesejados induzidos pelas radiações ionizantes podem surgir principalmente na região bucal. Hipogeusia, alterações na odontogênese e disfunções das glândulas salivares, como a xerostomia, que pode predispor à formação

de mucosite e conseqüentemente cárie de radiação (English *et al.*, 1954; McGinnis *et al.*, 1987; Takeda *et al.*, 1987; Dahllöf *et al.*, 1988; Dahllöf *et al.*, 1994; Takinami *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1996; Epstein *et al.*, 1997; Dumbrigue *et al.*, 2000; Epstein *et al.*, 2000; Huber; Terezhalmay, 2003; White; Pharoah, 2007). Alterações na composição bioquímica salivar também são detectadas, como a diminuição dos níveis do fator de crescimento epidérmico (EGF).

Com o advento de modernas técnicas laboratoriais, a compreensão sobre os complexos mecanismos que controlam os efeitos biológicos pode ser ampliada. O termo Biologia Molecular é usado para descrever uma área que inclui conhecimentos interdisciplinares: Fisiologia, Citologia ultra-estrutural, Bioquímica e Genética, e os dois maiores desafios no seu desenvolvimento são: determinar a natureza estrutural e de regulação dos genes envolvidos nos processos de diferenciação e elucidar os mecanismos de controle da expressão seqüencial do gene.

Primeiramente, células dos mamíferos foram cultivadas em coágulos sangüíneos, e por muitas décadas todos os esforços para definir as exigências mínimas para o crescimento celular falharam. Testes *in vitro* demonstraram que, mesmo em um meio contendo todos os nutrientes quimicamente definidos como óbvios, tais como: glicose, aminoácidos e vitaminas, as células somente cresciam se este meio fosse suplementado com soro, o fluido que permanece após a coagulação do sangue (Alberts *et al.*, 1997). Os componentes essenciais fornecidos pelo soro são proteínas altamente específicas denominadas fatores de crescimento.

Embora se tenham verificado muitos progressos na identificação das moléculas responsáveis pela sinalização, muito pouco se conhece sobre o mecanismo de atuação, para induzir a organogênese.

O EGF exerce um papel fisiológico na odontogênese e o folículo dentário é a principal estrutura na qual o fator de crescimento

atua. O folículo dentário, e posteriormente, os tecidos do ligamento periodontal são os únicos que expressam o EGF durante todas as fases da erupção de uma forma constante, o que pode caracterizá-los como tecidos capazes de regular todo o processo eruptivo (Wise et al., 1992; Kronmiller, 1995; Wise; Lin, 1995; Wise, 1998; Peixoto et al., 2003).

No processo de erupção, o EGF interage com outras moléculas, tais como: fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que potencializa ou inibe respostas da maioria das células a outros fatores de crescimento; a interleucina 1 (IL-1), que aumenta a reabsorção óssea estimulando a produção do fator de estimulação de colônia 1 (CSF-1), molécula esta também responsável pela quimiotaxia das células mononucleares precursoras das células osteoreabsortivas.

Os efeitos biológicos do EGF são mediados por uma interação com seu receptor da superfície celular específico e de alta afinidade, o receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR). Tanto o EGF quanto o EGFR apresentam-se freqüentemente desregulados em lesões císticas e nas células cancerosas, e sua expressão é um fator desfavorável no prognóstico precoce de carcinomas e sarcomas (Yang; Meng, 1994; Grünwald; Hidalgo, 2003; Demiral, 2004; Milano; Magné, 2004; Baumgart et al., 2007). O EGFR é considerado o principal alvo nas novas terapias contra o câncer (Zimmermann et al., 2006).

O objetivo no presente trabalho foi avaliar imunohistoquimicamente o efeito da radioterapia na expressão do EGF durante a odontogênese de camundongos, uma vez que essas moléculas são fundamentais para o desenvolvimento de vários órgãos, em especial os elementos dentários.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Radiobiologia**

A radiobiologia é a área da ciência que estuda os efeitos biológicos das radiações ionizantes. Essas radiações podem interagir diretamente com os componentes celulares (efeito direto) ou de modo indireto pela radiólise da água (efeito indireto). Após interação das radiações ionizantes com as células, ocorrem alterações celulares e moleculares, sendo o DNA um dos alvos mais importantes das radiações (Segreto; Segreto, 2000). Existe diferença na resposta radiobiológica entre o tecido normal e o tumoral, bem como entre os diferentes tecidos normais, do ponto de vista de lesão. A resposta está relacionada com a capacidade da célula de reparar ou não as lesões radioinduzidas. Em seres humanos, a Síndrome aguda de radiação (SAR) descreve os efeitos clínicos após irradiação de corpo todo com doses únicas acima de 0,5 Gray (Gy), e ocorre devido a falência em órgãos de três sistemas: hemocitopoéticos (doses entre 1 a 10 Gy), gastrintestinal (doses entre 10 e 50 Gy) e sistema nervoso central (doses acima de 50 Gy).

Em camundongos, Dainiak (2002) divide a exposição à radiação em dois níveis: dose baixa (low-dose) que equivale a um valor igual ou menor a 1 Gy; e dose alta (high-dose) que corresponde a um valor maior que 1 Gy. Vários níveis de toxicidade clínica das radiações ionizantes podem ser assim classificados: leve (1-2 Gy), moderado (2-4 Gy), severo (4-6 Gy), muito severo (6-8 Gy) ou letal (acima de 8 Gy).

Qualquer tumor pode ser destruído se a dose empregada for suficiente, no entanto o fator limitante é o montante de radiação que o tecido normal adjacente poderá tolerar (Huber; Terezhalmly, 2003).

Segundo White e Pharoah (2007), os efeitos biológicos das radiações ionizantes poderiam ser divididos em duas categorias: efeitos determinísticos e estocásticos. Efeitos determinísticos são aqueles nos quais a gravidade da resposta é proporcional à dose e ocorrem em todas as pessoas caso a dose seja suficientemente alta. Os efeitos estocásticos são aqueles nos quais a probabilidade do desenvolvimento de alteração, em vez de sua gravidade, é dose-dependente (a pessoa apresenta ou não a condição).

## **2.2 Efeitos da radiação sobre os tecidos bucais**

### **2.2.1 Mucosa bucal**

Mucosite induzida pela radiação é aparentemente modificada pelo nível de concentração de EGF salivar. O alto nível salivar de EGF, prévio ao tratamento radioterápico, pode estar associado a um dano menos severo na mucosa. Epstein et al. (2000) afirmaram que o fator de crescimento epidérmico humano (hEGF) pode estimular o desenvolvimento e a reparação da mucosa após a irradiação.

Lesões associadas à radioterapia geralmente aparecem em tecidos não-queratinizados, como: lábio, mucosa bucal, palato mole, faringe, soalho da boca e língua. A mucosite está associada com edema e eritema do tecido afetado, seguido de descamação (Huber; Terezhalmly, 2003). Com protocolos radioterápicos fracionados, pode ocorrer uma reparação do epitélio que pode conter os efeitos destrutivos da radiação.

O epitélio da mucosa bucal contém uma camada basal composta de células radiosensíveis intermitóticas vegetativas e diferenciadas. Próximo ao final da segunda semana de radioterapia, à medida que algumas células superficiais morrem, a mucosa começa a mostrar algumas áreas de vermelhidão e inflamação (mucosite). Com a continuidade da terapia, a mucosa irradiada começa a ulcerar, formando pseudomembranas brancas ou amareladas (White; Pharoah, 2007).

Lee et al. (2007) demonstraram que EGF administrado por via oral pode facilitar a recuperação de mucosite e feridas que surgem após exposição à radiação em cavidade bucal de ratos.

### 2.2.2 Papilas gustativas

As papilas linguais gustativas são sensíveis à radiação. Hipogeusia e ageusia são queixas freqüentes associadas à radioterapia de cabeça e pescoço. Histologicamente, as papilas gustativas demonstram sinais de atrofia a partir de doses de 10 Gy e em dois a quatro meses após o início do tratamento. Percepção de sabores ácidos e amargos são normalmente mais afetados. Pode ser exacerbado pela xerostomia e mucosite, e é tipicamente transitório (Huber; Terezhalmay, 2003).

A recuperação do paladar pode ocorrer a partir de 60 a 120 dias após a irradiação (White; Pharoah, 2007).

### 2.2.3 Glândulas salivares

As Glândulas salivares são muito sensíveis às radiações ionizantes. Zeilstra et al. (2000) demonstraram que uma dose única de 15 Gy de raios X pode induzir perda celular, e conseqüente perda de função

em glândula submandibular de ratos. Os autores afirmaram que tratamentos prévios com sialogogos atenuam de forma transitória estes efeitos biológicos.

Radioterapia causa degeneração aguda e necrose das células acinares, acompanhada de tentativas de regeneração. Huber e Terezhalmay (2003) relataram que pode ocorrer fibrose e atrofia do tecido glandular nas glândulas salivares, de acordo com a dose de radiação a que forem submetidas.

O grau de redução do fluxo salivar é dose-dependente. (White; Pharoah, 2007). As alterações salivares têm profunda influência sobre a microbiota bucal e, secundariamente, sobre a dentição, em geral levando a cáries de radiação que ocorrem devido ao baixo volume da saliva espessa, viscosa e acidogênica. Ocorre aumento nos níveis de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* e *Candida albicans*.

## **2.3 Fases da Odontogênese**

### **2.3.1 Formação da banda epitelial primária**

Mjör e Fejerskov (1990) afirmaram que os dentes molares decíduos formam-se a partir da lâmina dentária, e os seus sucessores permanentes originam-se de sua extensão distal, denominada lâmina dentária sucessória.

No embrião humano, por volta do vigésimo dia, a cavidade bucal primitiva é revestida por um epitélio pavimentoso estratificado de apenas duas ou três camadas de células que recobre um mesênquima que está sendo invadido por células originárias das cristas neurais (Arana-Chavez, 1997). refere que são as células

ectomesenquimais as responsáveis pela indução do epitélio bucal primitivo, o qual, ao redor do trigésimo sétimo dia de vida intra-uterina, começa a proliferar, invadindo o ectomesênquima subjacente, formando uma banda contínua em forma de ferradura na região onde futuramente serão formados os arcos dentários. Este cordão epitelial, denominado banda epitelial primária, bifurca-se, formando duas populações epiteliais proliferativas que seguem a mesma forma dos arcos, ficando, portanto, uma paralela à outra. A banda epitelial situada do lado externo continua sua proliferação e aumenta a sua largura e, com isso, o número de suas células, sofre degeneração da sua região central, dando lugar a uma fenda que constituirá o sulco vestibular; por essa razão, denomina-se lâmina vestibular. A proliferação epitelial situada do lado interno originará o futuro arco dentário e denomina-se, portanto, lâmina dentária.

### 2.3.2 Fase de botão

A fase de botão representa o verdadeiro início da formação do dente, quando a lâmina dentária após a sua proliferação inicial uniforme, passa a apresentar, em alguns locais, atividades mitóticas diferenciadas. A partir da oitava semana de vida intra-uterina, em cada arco originam-se dez pequenas esférulas que invadem o ectomesênquima, representando o início da formação dos dentes decíduos. Os autores afirmam ser possível observar numerosas atividades mitóticas devido à alta atividade proliferativa, e as células epiteliais apresentam aspecto normal, embora seja possível diferenciar as células cúbicas ou cilíndricas baixas da periferia, de células poligonais do centro. Para Katchburian e Arana-Chavez (1999), o ectomesênquima

subjacente apresenta discreta condensação de suas células em torno da parte mais profunda da esférula epitelial.

### 2.3.3 Fase de capuz

A resistência criada pela condensação ectomesenquimal localizada na parte central faz com que a proliferação epitelial do botão resulte, principalmente, no crescimento da sua borda (Arana-Chavez, 1997). A porção epitelial que será responsável pela formação do esmalte passa a ser denominado órgão do esmalte. As células da concavidade adjacente à condensação ectomesenquimal constituem o epitélio interno do órgão do esmalte e as células do lado externo do capuz constituem o epitélio externo do órgão do esmalte. a condensação do ectomesênquima aumenta nesta fase, observando-se claramente uma condensação de células denominada papila dentária, responsável pela formação da dentina e da polpa. O ectomesênquima que rodeia tanto o órgão do esmalte como a papila dentária também sofre condensação, porém, com suas células alinhadas em torno do germe em desenvolvimento. Essa condensação periférica é conhecida como folículo dentário, responsável pela formação do cimento, do ligamento periodontal e do osso alveolar. Ainda nesta fase, capilares penetram o folículo dentário, especialmente na região adjacente ao epitélio externo do órgão do esmalte. Assim sendo, a nutrição da porção epitelial do germe dentário provém, principalmente, da vascularidade do folículo.

A intensa proliferação de células epiteliais foi destacada por Katchburian e Arana-Chavez (1999). Nesta fase seu crescimento não é uniforme e apresenta uma forma que se assemelha a um boné.

O termo órgão do esmalte, usado inicialmente para descrever essa estrutura, segundo Ten Cate (2001) deveria ser mudado

para órgão dentário, por retratar mais exatamente as funções dessa estrutura, responsável por determinar a forma da coroa, iniciar a formação de dentina, formar o esmalte e estabelecer a junção dentogengival. Os componentes do órgão dentário foram, do mesmo modo, renomeados: epitélio dentário interno e epitélio dentário externo.

#### 2.3.4 Fase de campânula

Ruch (1985) cita dois fatores indutores externos de origem epitelial que levam à diferenciação dos odontoblastos: a necessidade de que as células da crista neural entrem em contato com o ectoderma, assim que elas migram para o primeiro arco branquial; e a necessidade da presença do epitélio interno do órgão do esmalte para iniciar a diferenciação final dos odontoblastos. Os odontoblastos se retiram do ciclo celular, polarizam e secretam pré-dentina. A polarização implica importantes modificações citológicas: as células tornam-se mais longas, o núcleo assume posições basais excêntricas e as cisternas do retículo citoplasmático granular nivelam-se e tornam-se paralelas com o longo eixo da célula. A polarização e secreção de componentes de pré-dentina requerem a integridade do citoesqueleto.

O que um odontoblasto faz, certamente, é formar dentina. Ten Cate (1985) afirma que os odontoblastos são derivados de células da crista neural, entretanto, muitos outros tipos celulares, incluindo os tecidos de sustentação dentária, surgem do folículo dentário, também originário das células da crista neural.

Nesta fase, a proliferação epitelial vai diminuindo e conseqüentemente, o crescimento do órgão de esmalte, que apresenta a parte epitelial com o aspecto de um sino com a sua concavidade mais

acentuada. Com a diminuição da divisão celular tanto do órgão do esmalte quanto nas células ectomesenquimais, ocorre a diferenciação de diversas células do germe dentário. Os epitélios externo e interno formam a alça cervical, que irá constituir durante a fase final de indução da coroa a bainha epitelial radicular de Hertwig, responsável pela indução da formação da raiz do dente. Na região central, o retículo estrelado cresce em volume por causa do alongamento da distância entre as células e seus prolongamentos, fenômeno provocado pela maior quantidade de água, associada a outras moléculas como as proteoglicanas, descreveram Katchburian e Arana-Chavez (1999). A dentinogênese inicia-se antes da amelogênese. A diferenciação das células ectomesenquimais da papila dentária em odontoblastos é induzida, com a participação da lâmina basal, pelas células do epitélio interno que eram, até então, cilíndricas baixas com núcleo próximo à lâmina basal, e tornam-se cilíndricas altas e passam a se denominar pré-ameloblastos. O seu núcleo passa a se localizar do lado oposto à papila dentária, fenômeno denominado inversão de polaridade.

Outros dois importantes eventos ocorrem durante o estágio de sino para Ten Cate (2001): primeiro, a lâmina dentária que une o germe dentário ao epitélio bucal se desintegra, formando ilhas de células epiteliais, separando, assim o dente em desenvolvimento do epitélio bucal; segundo, o epitélio interno do órgão do esmalte, ou epitélio dentário interno, dobra-se, tornando-se possível reconhecer a forma da futura coroa do dente.

### 2.3.5 Fase de coroa

Uma característica típica dos dentes, segundo Van Der Linden (1986) é que as suas coroas são formadas com seus tamanhos definitivos. Em consequência, seus aumentos dimensionais ocorrem antecipadamente em relação ao aumento proporcional das estruturas circunjascentes.

Dentina e esmalte são dois tecidos diferentes em origem, natureza e estrutura. Na dentina é inicialmente formada a matriz orgânica, constituída por fibrilas colágenas, proteoglicanas, glicoproteínas, outras proteínas não colágenas (fosfoproteínas, osteopontina, osteonectina, osteocalcina e sialoproteína óssea). Nas fases iniciais da sua formação, as “vesículas da matriz”, originadas a partir dos próprios odontoblastos, são os locais onde são depositados os primeiros cristais de mineral, e o restante da matriz se mineraliza posteriormente. De acordo com Arana-Chavez (1997), em contraste, uma matriz de natureza diferente à dentinária é formada no esmalte, constituída por proteínas não colagênicas pertencentes a dois grupos (amelogeninas e enamelinas) e, quase simultaneamente, os cristais de hidroxiapatita começam a ser depositados, porém entre as moléculas da matriz e, não, sobre elas, como ocorre na dentina.

Também denominada fase avançada de campânula, onde ocorrem os eventos ligados à diferenciação. A dentinogênese e a amelogênese, que caracterizam a fase, ocorrem desde os locais correspondentes às cúspides até a região cervical. A formação da dentina é centrípeta (de fora para dentro), enquanto que a do esmalte é centrífuga (de dentro para fora), descreveram Katchburian e Arana-Chavez (1999).

#### 2.3.6 Fase de raiz

As células da camada interna da bainha radicular de Hertwig irão induzir as células ectomesenquimais da papila a se diferenciarem em odontoblastos, para a formação da dentina radicular. Entretanto, como a função da bainha acaba após esta indução, as células interrompem sua proliferação. Enquanto isso, os odontoblastos recém-diferenciados formam dentina radicular, aumentando gradualmente o comprimento da raiz. Pelo fato de apenas as células da bainha localizadas imediatamente adjacentes ao diafragma epitelial continuarem proliferando, enquanto as mais afastadas, que já induziram a diferenciação dos odontoblastos, não mais se dividirem, ocorre uma defasagem entre o crescimento da raiz e a parte da bainha, que não acompanha esse crescimento. Por esta razão, Arana-Chavez (1997) afirma que apenas a porção mais apical da bainha de Hertwig continua ligada à raiz. Em consequência, aparecem espaços entre as células, fenômeno chamado de fragmentação da bainha epitelial de Hertwig. O contínuo crescimento da raiz gera aumento dos espaços, os quais acabam coalescendo, ficando a bainha logo reduzida à cordões. Com o avanço dessa fragmentação, os cordões se rompem, constituindo grupos isolados de 3 a 6 células denominados restos epiteliais de Malassez, as quais possuem poucas organelas, refletindo seu estado inativo.

Durante a rizogênese, nota-se uma migração apical da bainha epitelial induzindo paralelamente a diferenciação de células da papila dentária em odontoblastos, responsáveis pela síntese de dentina. A deposição da dentina ao longo da raiz é seguida da desorganização e fragmentação da bainha de Hertwig. Lourenço (1997) relatou que a detecção de células apoptóticas na bainha estava morfológicamente associada com a fragmentação da bainha epitelial de Hertwig e com a migração de células mesenquimais do folículo dentário para a superfície dentinária.

A presença de células de origem epitelial é necessária para o processo de diferenciação dos odontoblastos, pelo fato da região radicular do dente ser também constituída de dentina. No final da fase de coroa, quando os eventos de diferenciação alcançam a região da alça cervical, os epitélios interno e externo do órgão do esmalte, que constituem a alça, proliferam em sentido apical para induzir a formação da raiz do dente. Devido à presença do folículo dentário e do osso da base da cripta óssea, a proliferação não se aprofunda verticalmente, sofrendo o epitélio uma dobra constituindo o diafragma epitelial, restringindo a região proliferativa e originando outra estrutura: a bainha epitelial radicular de Hertwig, relataram Katchburian e Arana-Chavez (1999). A continuação da proliferação da bainha coincide com o início da erupção ativa do dente, observando-se a movimentação do germe dentário no sentido coronário, enquanto que, ao mesmo tempo, vai sendo formada a raiz (acreditava-se antigamente que a proliferação da bainha durante a formação da raiz ocorreria em sentido apical, com aprofundamento gradual no sentido do futuro ápice radicular).

#### **2.4 Histórico e propriedades físicas e químicas do EGF**

Lacassagne (1940) chamou a atenção para um dimorfismo sexual nos camundongos: a porção tubular das glândulas salivares submandibulares é mais desenvolvida nos machos do que nas fêmeas. Entretanto, a situação era inversa quando testosterona era injetada nas fêmeas, e estrogênio nos machos, o que sugeria uma atuação dos sistemas endócrinos na diferenciação e crescimento dos órgãos.

Extratos obtidos a partir de sarcomas de camundongos, veneno de cobra e das glândulas salivares submandibulares de camundongos eram potentes fatores de crescimento de células nervosas. As propriedades químicas de todos esses fatores indicavam que eram proteínas moleculares, mas não eram idênticos. O fator salivar foi o último a ser isolado e é o mais potente. Causou um aumento de volume de seis vezes no gânglio simpático em relação a um gânglio controle. A injeção do extrato salivar parcialmente purificado em camundongos recém nascidos, segundo Levi-Montalcini e Cohen (1960), causou os seguintes efeitos: nanismo (menor ganho de peso), falhas no crescimento dos pêlos, abertura precoce das pálpebras (no 7º dia, quando o normal ocorre do 12º ao 14º dia), assim como erupção e mineralização dos incisivos superiores (do 6º ao 7º dia, quando o usual ocorre do 8º ao 10º dia). Efeitos esses similares aos causados pela cortisona em ratos recém nascidos.

O fator dente-pálpebra possui alta temperatura estável e não dializável; é uma proteína antigênica quando injetado em coelhos, podendo ser precipitado com a ajuda de um anticorpo específico e tem um ponto isoelétrico de pH 4,2. Cohen (1962) relatou que os aminoácidos que fazem parte da sua constituição são: ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cistina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, histidina, arginina, triptofano, ácido cisteico e sulfóxido de metionina. Uma particularidade química seria a ausência de fenilalanina e lisina.

Em um trabalho posterior, Cohen (1965) demonstrou que, o EGF uma pequena proteína com peso molecular de 6045 Da, originariamente denominado fator de crescimento devido a sua capacidade de estimular a proliferação epidérmica, e seus objetivos incluem células de origem endodérmica, ectodérmica e mesodérmica. O EGF participa da formação de órgãos que tem sua origem embriológica a partir de uma interação entre epitélio e ectomesênquima adjacente, como

as glândulas salivares e as estruturas dentárias. No mínimo, um dos efeitos do EGF seria a capacidade de estimular a proliferação epidérmica (aumentam o número de camadas de células da epiderme e a orientação colunar das células basais demonstra perda evidente), e eventual queratinização em culturas orgânicas de pele intacta de embriões de aves.

Um hormônio polipeptídeo foi isolado da urina humana por Cohen e Carpenter (1975): fator de crescimento epidérmico humano (hEGF). O hEGF apresenta peso molecular 5700 Da, um pH mais alcalino que o EGF isolado a partir de camundongos (mEGF), e aparentemente competem pelos mesmos locais na membrana celular. Os efeitos biológicos do hEGF, no mínimo qualitativamente, são similares aos previamente descritos para o mEGF, tais como o estímulo do crescimento de fibroblastos do prepúcio humano em cultura, assim como de células epiteliais córneas em embriões de aves em cultura orgânica, e na indução *in vivo* da abertura precoce das pálpebras de camundongos recém nascidos. A composição de aminoácidos dos dois polipeptídeos indicam certas similaridades como a presença de uma metionina e de seis resíduos de cistina por molécula.

Em um clássico trabalho de revisão, Carpenter e Cohen (1979) descreveram sobre a relação que existe entre o mEGF, uma das proteínas mais estáveis energeticamente, e um hormônio antsecretório gástrico, a urogastrona, baseados na comparação das seqüências de aminoácidos nos dois polipeptídeos. Dos 53 resíduos ácidos compreendidos por cada um dos polipeptídeos, 37 são comuns em ambas as moléculas, e 3 pontes dissulfeto são formadas relativamente nas mesmas posições. Os autores sugerem fortemente que o hEGF e a urogastrona humana são idênticos. O hEGF é um polipeptídeo encontrado na urina que apresenta características químicas similares ao mEGF. As pontes dissulfeto no mEGF são requeridas para atividades



deles, o Fator de crescimento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) (Figura 1A), que está relacionado com o EGF, (31 dos 50 resíduos de TGF- $\alpha$ , incluindo todas as 6 cisteínas, são encontradas em posições correspondentes na seqüência do EGF humano), e se liga ao EGFR (Figura 1B), enquanto o outro, TGF- $\beta$ , é proteína estruturalmente diferente que possui um receptor distinto. O TGF- $\beta_1$  pode penetrar nos capilares fenestrados do folículo e atuar como um quimioatraente para o recrutamento de monócitos para o folículo dentário. Esta provavelmente não seria a única função do TGF- $\beta_1$ , na erupção dentária.

Alguns fatores de crescimento são do tipo célula-específico, estimulando a divisão apenas das células com receptores apropriados. Fatores extracelulares, como o TGF- $\beta_1$ , antagonizam os efeitos dos fatores de crescimento, diminuindo ou prevenindo a divisão celular (Lehninger et al., 1995).

Shroff et al. (1996) relataram que o EGF tem sido também encontrado em uma variedade de outros tecidos, tais como: glândulas de Brunner do duodeno, túbulos contorcidos distais dos rins, e também em fluidos corporais (saliva, líquido amniótico e leite). Os efeitos biológicos do EGF são mediados por uma interação com receptores da superfície celular específicos e de alta afinidade. O EGFR é um tipo de glicoproteína transmembrana composto de 1186 aminoácidos, com peso molecular de 170000 Da e é denominado receptor catalítico. Esses receptores são cinases protéicas específicas para a tirosina e têm a parte que adere ao fator de crescimento exposta na superfície da membrana. A parte que se localiza no citoplasma tem ação enzimática, ou está diretamente ligada a uma enzima. Quando a extremidade externa desses receptores recebe o sinal químico, a parte citoplasmática, que é uma cinase protéica, torna-se ativa.

A maioria dos receptores do fator de crescimento, como o EGFR, é equipada com a atividade intrínseca da enzima

tirosinoquinase, que é ativada após a união do ligante. Segundo Cotran et al. (1996), a união do ligante induz alteração conformacional do domínio extracelular, que, por sua vez, induz a dimerização de receptores.

Sobre o EGFR, Junqueira e Carneiro (1997) relataram que se trata de um tipo de glicoproteína transmembrana que atua mais diretamente e são chamados receptores catalíticos. Esses receptores são cinases protéicas específicas para a tirosina e têm a parte que adere ao sinal químico (hormônio, fator de crescimento) exposta na superfície da membrana, e a parte que se localiza no citoplasma tem ação enzimática, ou está diretamente ligada a uma enzima. Quando a extremidade externa desses receptores recebe o sinal químico, a parte citoplasmática, que é uma cinase protéica, torna-se ativa.

A dimerização do receptor induz a sua atividade quinase ou da tirosina associada, que não é receptor. Quando ativado, o receptor geralmente fosforila a si próprio em múltiplos resíduos tirosina que passam a servir de sítio de ligação para um pequeno grupo de proteínas sinalizadoras intracelulares. Dessa maneira, um complexo de sinalização composto por múltiplas proteínas é ativado, transmitindo o sinal para o interior da célula, relatou Alberts et al. (1997).

Os membros da família do EGFR são essencialmente voltados para o desenvolvimento embrionário, e para a homeostasia em tecidos adultos tanto de vertebrados quanto de invertebrados (Hubbard, 2006). Sinalização acentuada desses receptores, devido a uma mutação ou uma superexpressão contribui para vários tipos de câncer.

## **2.5 Aspectos da radiobiologia relacionada à odontogênese**

Gartner et al. (1977) avaliaram os efeitos biológicos causados no desenvolvimento de incisivos de camundongos por irradiação por raios X. Fêmeas prenhes foram submetidas à dose única de 400 rad no 12º dia *post coitum*, e sacrificadas no 14º e 20º dias de gestação. O desenvolvimento dos incisivos apresentou-se com retardo, e a análise microscópica óptica demonstrou vasos pulparez que apresentavam-se com aumento em seu calibre, e as paredes dos vasos não mantinham sua integridade estrutural. Ameloblastos e odontoblastos encontravam-se anormais com relação à morfologia e a formação de tecido duro inibida em áreas isoladas.

O desenvolvimento dos terceiros molares em 47 crianças com doença de Hodgkin, e tratadas por radioterapia foi avaliado por McGinnis et al. (1987), por meio de estudo cronológico comparativo em radiografias panorâmicas. A agenesia dos terceiros molares foi considerada uma provável seqüela da radioterapia, quando a radiação é administrada nos tecidos circundantes aos dentes em pacientes que apresentam idade compatível com a formação dentária em fase de botão. Os autores relatam também a ocorrência de hipoplasia do esmalte e prejuízo na rizogênese.

Takeda et al. (1987) relataram caso clínico de um indivíduo do sexo feminino, que aos três anos e um mês de vida foi submetido ao tratamento radioterápico devido à ocorrência de glioma em sua retina do olho direito. Aos 27 anos de idade, foi constatada a ausência completa da rizogênese de incisivos centrais, canino, e pré-molares superiores direitos. A extensão do dano ao desenvolvimento dentário é aparentemente dependente de dois fatores: estágio da histogênese de cada dente individualmente, e a dose de irradiação.

Um total de 16 crianças portadoras de leucemia aguda, submetidas à irradiação total de corpo, e posteriormente a transplante de medula óssea foram acompanhadas por um período de seis anos por

Dahllöf et al. (1988). Todos os indivíduos estudados apresentaram prejuízo no desenvolvimento das raízes dentárias. Fechamento apical prematuro ocorreu em cinco dos casos avaliados. Hipoplasia de esmalte foi constatada em quatro crianças, e três apresentavam microdontia. Entretanto os autores afirmam que as crianças que passaram pelo transplante de medula antes dos seis anos de idade foram as que apresentaram as alterações dentárias mais severas.

Distúrbios no desenvolvimento dentário de um indivíduo portador de leucemia linfoblástica aguda foram avaliados por Dahllöf et al. (1994). Aos dois anos e três meses de idade foi submetido ao tratamento quimioterápico, e aos quatro anos e três meses recebeu uma irradiação total de corpo com uma dose de 10 Gy, procedimento este prévio ao transplante de medula óssea. Após um período de dois anos, radiografias panorâmicas demonstraram a ocorrência de raízes estreitas e fechamento apicais prematuros nos incisivos e primeiros molares permanentes. Os resultados demonstraram que a quimioterapia pode principalmente induzir distúrbios qualitativos em dentina e esmalte, enquanto a radioterapia pode provocar tanto mudanças qualitativas quanto quantitativas.

Takinami et al. (1994) descreveram caso clínico de indivíduo que aos sete anos de idade apresentava diagnóstico de higroma cístico, que se estendia desde a nasofaringe até o mediastino. Tratamento cirúrgico foi considerado impraticável, e foi preconizado tratamento radioterápico. Os maxilares estavam incluídos na área submetida à radiação. Após cinco anos, foram realizados exames radiográficos periapicais e panorâmico, que demonstraram a ocorrência de alterações de vários elementos dentários, como hipoplasia das raízes e microdontia. Também foi constatada hipoplasia mandibular.

Radioterapia na região de cabeça e pescoço pode afetar significativamente o desenvolvimento da dentição, principalmente em função do estágio em que se encontra a formação dentária e a dose de

radiação absorvida (Huber; Terezhalmay, 2003). Ameloblastos em maturação podem ser permanentemente afetados com uma dose de cerca de 10 Gy, e atividade ameloblástica cessa após exposição de 30 Gy. Defeitos induzidos pela radiação incluem anodontia parcial e total, hipodesenvolvimento dentário, rizogênese incompleta, apicificação precoce e defeitos no esmalte localizados. Podem surgir também problemas como: aumento de sensibilidade dentária, atrofia pulpar e fibrose.

Manzi (2005) demonstrou que a dose de 4 Gy de radiação X promove efeito deletério nas dimensões oclusais dos molares de ratos em desenvolvimento, nos estágios de lâmina dentária, botão e principalmente no estágio de sino, no qual apresentaram fusão de cúspides, fraturas coronárias e túbulos dentinários levemente delgados e dispersos.

## **2.6 Aspectos da biologia molecular relacionada à odontogênese**

O início da morfogênese e diferenciação celular dos molares de embriões de camundongos em cultura é inibido pelo EGF, que ao mesmo tempo pode estimular a proliferação celular nos tecidos que cercam os germes dentários. O efeito inibitório do EGF na morfogênese ocorre durante a fase de capuz, mas os germes dentários quando alcançam a fase de campânula, se desenvolvem e diferenciam na presença de EGF (Partanen; Thesleff, 1987). Os autores acreditam que o EGF estimula ou mantém a proliferação de células indiferenciadas durante o desenvolvimento embrionário.

O EGF está presente no interior das células do folículo dentário *in vitro*, e o EGFR está presente na superfície das células. A

presença do EGF no folículo dentário, assim como no órgão de esmalte, poderia provar sua origem endógena para regular a erupção tanto com efeitos autócrinos como parácrinos (Wise et al., 1992). A localização do EGF foi avaliada, assim como a do EGFR durante a erupção pré-funcional dos primeiro e segundo molares mandibulares de ratos. A localização do EGF, determinada através da imuno-histoquímica, demonstrou alguns paralelos com o seu receptor, mas existem diferenças específicas. Os resultados mostraram que o folículo dentário marcou fortemente para o EGFR do dia 0 ao dia 8 pós-natal, declinou a marcação no dia 9, e a partir do dia 10, esta vai diminuindo progressivamente. Com respeito ao EGF, sua maior expressão no folículo dentário ocorre também do dia 0 ao dia 8, entretanto, a partir do dia 9, alguma marcação ainda permanece no folículo, assim como em células do osso alveolar.

Em ratos, EGFRs se apresentaram concentrados em células basais do epitélio da gengiva e nas células dos restos de Malassez, quando ativados e ao proliferarem, contribuem para a formação de cistos odontogênicos, afirmaram Tajima et al. (1992).

Estudos prévios têm demonstrado o efeito direto do TGF- $\beta_1$  em células do folículo dentário (fibroblastos) em cultura, estimulando-as a secretar mais proteínas da matriz extracelular, e conseqüentemente, contribuir para a formação do tecido conjuntivo do ligamento periodontal. No mesmo trabalho, Lin e Wise (1993) mostraram que ocorre aumento na expressão de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) do TGF- $\beta_1$  quando células do retículo estrelado de ratos em cultura são incubadas em EGF.

A IL-1 $\alpha$  pode exercer um papel sinalizador da iniciação da erupção dentária em molares da mandíbula de ratos. Localizada no retículo estrelado epitelial próximo ao folículo dentário, a IL-1 $\alpha$  pode exercer efeito nas células do folículo dentário, suportada pelo fato de que o IL-1 $\alpha$ -receptor mRNA é realçado após incubação com EGF (WISE et al., 1995a).

Os mesmos autores afirmaram que o mais potente estímulo para a erupção vem do fator de estimulação de colônia 1 (CSF-1). A expressão de CSF-1 nos primeiros molares de ratos, de 0 a 10 dias de vida pós-natal foi avaliada, e a marcação máxima ocorreu no 3º dia contribuindo para o influxo de monócitos. A partir de então, o CSF-1 permaneceu essencialmente localizado no folículo dentário com um declínio gradual da intensidade. Wise et al. (1995b) estabeleceram uma relação entre a molécula (CSF-1), as células (monócitos) e o tecido (folículo dentário), que aparentemente exerce um papel maior na erupção dentária.

O EGF foi fortemente sugerido como um regulador natural da erupção, estimulando a proliferação de células epiteliais e mesenquimais, assim como influenciando outras funções celulares como a síntese de macromoléculas e a reabsorção óssea. Tanto o EGF quanto o EGFR foram localizados no folículo dentário, osso alveolar e ameloblastos de camundongos, antes e durante o estágio pré-funcional de erupção. A discrepância entre o desenvolvimento dos camundongos e dos ratos pode ser devido ao fato da erupção dentária de ambos não seguirem o mesmo modelo (Shroff et al., 1996).

O efeito do EGF em células do folículo dentário de ratos em cultura foi determinado por Lin et al. (1996). Os resultados demonstraram que o número de células praticamente dobrou em um período de seis dias, se comparado a um grupo controle. O EGFR estava presente em células do folículo dentário, ao passo que no grupo controle, não houve marcação para o receptor. Para determinar *in vivo* os efeitos do EGF na expressão do mRNA receptor e do seu próprio mRNA, ratos recém-nascidos de 0 a 9 dias receberam doses injetáveis diárias de EGF. Nos animais em que o EGF foi administrado nos dias 2 ou 5 houve um realce na expressão do mRNA do receptor, o que não ocorreu no grupo controle. A injeção de EGF não acentuou a expressão de seu próprio

mRNA em quaisquer idades. Entretanto o EGF mRNA estava presente logo após o nascimento, mas reduzido ao 9º dia.

Que e Wise (1997) demonstraram que tanto o CSF-1 quanto a proteína quimiotáctica para monócitos 1 (MCP-1) são quimiotácticas para monócitos *in vitro*, embora a MCP-1 aparentemente seja um quimioatraente mais potente. Ambos podem ser responsáveis pelo influxo de monócitos necessários dentro do folículo dentário para iniciar a erupção. Os autores afirmaram que eventos de desenvolvimento podem ser consumados na ausência de um suposto gene. Por exemplo, a erupção dentária pode ocorrer quando o gene para o TGF- $\alpha$  é anulado. É provável que o EGF substitua o TGF- $\alpha$  porque ambos se ligam ao mesmo receptor.

A MCP-1 é uma quimiocina que estimula a quimiotaxia de monócitos *in vitro* e *in vivo*, é produzida localmente por vários tipos celulares, e é considerada uma importante reguladora do recrutamento de monócitos em algumas condições patológicas, onde sua expressão está tipicamente ligada. A MCP-1 é um tipo de mediador inflamatório secundário induzido por mediadores primários como a Interleucina 1 (IL-1), Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 6 (IL-6) ou Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Entretanto, sua expressão em condições que não sejam inflamatórias é pouco conhecida, e sua presença na erupção dentária representa um dos primeiros exemplos onde a expressão de uma quimiocina ocorre para controle de desenvolvimento. Volejnikova et al. (1997) também relataram que o recrutamento de monócitos ocorre em áreas de reabsorção óssea (ocorre formação de osteoclastos), e surpreendentemente, em áreas de formação óssea (sem osteoclastos), o que sugere que os monócitos possuem diferentes papéis funcionais, dependendo da área de atuação.

O TGF-1 $\beta_1$  incubado em fibroblastos do folículo dentário de ratos *in vitro* acentua a expressão de IL-1-receptor tipo I, uma

glicoproteína de 80 kDa que é o principal IL-1-receptor nas membranas dos fibroblastos. *In vivo*, a expressão de IL-1-receptor tipo I pode ser realçada após injeções de EGF em ratos. Wise e Zhao (1997) afirmaram que a IL-1 $\alpha$  não exerce efeito na expressão do IL-1-receptor tipo I.

A IL-1 $\alpha$  acentua a expressão de CSF-1 mRNA em células do folículo dentário de ratos *in vitro*, mas não causa efeito nos níveis do mRNA do CSF-1 receptor. Para Wise et al. (1997), o CSF-1 exerce um efeito autócrino tal na expressão do seu próprio mRNA, que poderia levar a um aumento na produção de CSF-1, causando um recrutamento das células mononucleares para o folículo dentário.

Para Wise (1998), o retículo estrelado possivelmente exerce o papel de relógio biológico devido à presença de moléculas com potenciais eruptivos.

A MCP-1 é uma molécula que pode causar a quimiotaxia de monócitos para o folículo dentário, onde vão iniciar os eventos celulares ligados à erupção. Assim como a MCP-1, uma outra molécula, também secretada por células do folículo dentário, é quimiotáctica para monócitos: o CSF-1. A expressão de CSF-1 é realçada por uma cascata de sinais moleculares: o EGF e o TGF- $\beta_1$  acentuam a presença da IL-1 $\alpha$ , que por sua vez, especificamente, realça a expressão de CSF-1. Que e Wise (1998) também declararam que os possíveis efeitos dessas moléculas em relação à expressão da MCP-1 pelo folículo dentário eram, até então, desconhecidos. Todas as moléculas potencialmente envolvidas com a erupção dentária (EGF, TGF- $\beta_1$ , IL-1 $\alpha$  e CSF-1) acentuam a expressão de MCP-1 em células do folículo dentário em cultura.

Células do folículo dentário de ratos *in vitro* sintetizaram e secretaram no meio a MCP-1. Segundo Wise e Huang (1999) a secreção é realçada quando as células são incubadas tanto com TGF- $\beta_1$ , quanto IL-1 $\alpha$ .

Wise et al. (2000) relataram sobre a proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP), que apresenta uma cadeia de 141 aminoácidos e se liga ao mesmo receptor do hormônio da paratireóide. Entretanto, em contraste, a PTHrP é produzida por uma variedade de células, especialmente em tecidos fetais, nos quais exerce um papel de regulador de desenvolvimento, tanto parácrino quanto autócrino. Localizada no retículo estrelado, a PTHrP pode exercer um efeito parácrino nas células do folículo dentário adjacente, influenciando a expressão de moléculas potencialmente relacionadas ao início da erupção. Em estudo *in vitro* realizado em células do folículo dentário de ratos, a capacidade da PTHrP de realçar a expressão tanto da MCP-1, quanto do CSF-1 foi demonstrada, sendo que a expressão máxima ocorreu após 30 min de incubação. No mesmo trabalho, a expressão do receptor para PTHrP foi acentuada, após as células terem sido incubadas com IL-1 $\alpha$ .

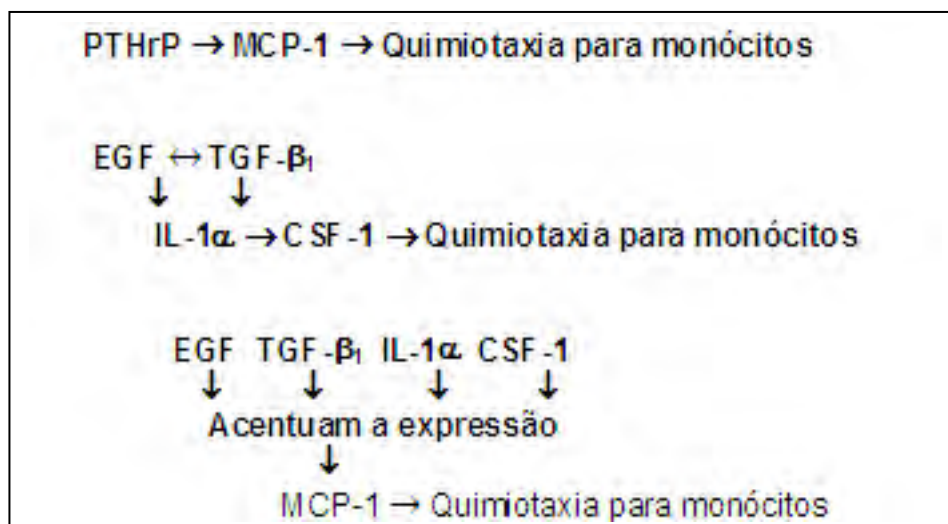


Figura 2 – Interações biomoleculares relacionadas à erupção. Peixoto et al., (2003)

O EGF exerce um papel fisiológico importante na erupção dentária, e seus principais focos são o folículo dentário e posteriormente já diferenciado como o ligamento periodontal. Peixoto et al. (2003) por meio da técnica imuno-histoquímica demonstraram que

nessas estruturas, o EGF se expressa durante todas as fases da odontogênese de forma constante, o que pode caracterizá-los como tecidos reguladores de todo o mecanismo.

O papel da PTHrP na erupção dentária é promover a osteoclastogênese, estimulando a expressão do fator de crescimento vasoendotelial (VEGF) no folículo dentário de ratos (Yao et al., 2007).

Assim como acontece na erupção dentária, a osteogênese associada com movimentos ortodônticos é mediada por várias moléculas osteoindutivas. Em geral muitas dessas moléculas são reguladas pelas tensões elásticas, e atuam estimulando a proliferação de células precursoras de osteoblastos no ligamento periodontal, com subsequente formação óssea e inibição de reabsorção (Wise; King, 2008).

## **2.7 Aspectos da Radiobiologia relacionada à Biologia Molecular:**

Existem fortes evidências que sugerem que o EGFR está envolvido na regeneração de tecidos normais submetidos à radioterapia, e que o dano tecidual normal agudo pode ser moderado por tratamento sistêmico com EGF (Lindgaard et al., 1997).

O interesse no papel das citocinas sobre as funções fisiológicas celulares da mucosa bucal está centrado na função do EGF, TGF- $\beta$  e da interleucina 11 (IL-11) (Epstein et al., 1997). Os mesmos autores afirmam que o EGF estimula o crescimento e diferenciação de vários tecidos, incluindo o epitélio bucal. Assim como ocorre em crianças saudáveis, pacientes acima dos 60 anos portadores de câncer apresentam altas concentrações de EGF na saliva. Uma rápida redução nos volumes de saliva estimulada foi constatada nesses pacientes na primeira semana de tratamento radioterápico, situação que perdura

durante todo o tratamento. Os níveis da concentração do EGF aumentam na saliva estimulada durante a primeira semana, e começam a declinar até o fim do tratamento, apresentando diminuição na concentração absoluta e combinada, com a redução do volume salivar durante o tratamento.

Ruifrok et al. (1997) estudaram possíveis mudanças na proliferação celular do trato gastrointestinal de camundongos após 5 Gy de irradiação, e o papel do EGF, TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  na resposta proliferativa. Os resultados demonstraram redução no número de células que expressavam TGF- $\beta$ , e nos níveis de expressão de TGF- $\beta$  nos tecidos analisados. Esta redução de TGF- $\beta$  pode iniciar um sinal de estímulo à proliferação pelo aumento na produção de TGF- $\alpha$  e EGF.

Alterações na composição bioquímica salivar foram descritas em pacientes submetidos à radioterapia por Dumbrigue et al. (2000). Foi coletada a saliva de 30 pacientes em períodos anterior e posterior ao tratamento radioterápico, e comparados a 18 indivíduos controle. Foram avaliados os níveis totais salivares de proteína e de EGF, e sua relação com a manifestação clínica de mucosite. Os resultados demonstraram aumento no número total de proteínas e queda nos níveis salivares de EGF. Os autores sugerem uma forte correlação entre o decréscimo de EGF e casos mais graves de mucosite.

O EGFR está implicado com a progressão de muitos tipos de cânceres epiteliais. Sua ativação induz modificações no interior da célula e contribui para vários processos, como proliferação celular, angiogênese e inibição de apoptose (Milano; Magné, 2004).

Para White e Pharoah (2007), torna-se evidente que o dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA) é o principal mecanismo por meio do qual a radiação induz morte celular, mutação e carcinogênese. A radiação gera diversos tipos de alterações no DNA: quebra em uma ou ambas as cadeias de DNA; ligação cruzada de cadeias de DNA dentro da

hélice, com outras cadeias de DNA ou com proteínas; mudança ou perda de uma base e ruptura das pontes de hidrogênio entre as cadeias de DNA. Os mesmos autores afirmam que a irradiação de proteínas em solução geralmente leva a mudanças nas estruturas secundárias e terciárias por meio de ruptura de cadeias laterais ou quebra de pontes de hidrogênio ou de dissulfeto. Tais mudanças provocam desnaturação. A dose de radiação necessária para induzir a desnaturação de uma quantidade significativa de proteínas é muito maior do que a necessária para induzir alterações celulares grosseiras ou morte celular.

O TGF- $\beta$  é classicamente descrito como um supressor tumoral, e o bloqueio da sua sinalização pode exacerbar a resposta de tumores epiteliais à radioterapia (Andarawewa et al., 2007). A radiação ionizante induz a rápida e persistente ativação de TGF- $\beta$ , que é conseqüentemente considerado o maior mediador das respostas das células e dos tecidos ao tratamento.

EGFRs são proteínas transmembrana que iniciam sinais citoplasmáticos por meio da autofosforilação de seus domínios intercelulares. Após a fosforilação, uma cascata de sinais é iniciado no citoplasma, para controlar a proliferação nuclear, ciclo celular e sobrevivência da célula. A inibição do EGFR é uma área de intensa pesquisa na terapia do câncer, com dois principais enfoques, ambos pela inibição da ativação do domínio intracelular: ou pela inibição da tirosinoquinase; ou pelo bloqueio do domínio extracelular com anticorpos monoclonais. Bussink et al. (2007) demonstraram que existem diversos mecanismos com os quais bloqueadores do EGFR podem potencializar a efetividade da radioterapia. O bloqueio do EGFR resulta em redução dos níveis de proliferação celular tumoral.

### 3 PROPOSIÇÃO

- a) Estudar os possíveis efeitos biológicos das radiações ionizantes na odontogênese de camundongos (*Mus musculus*), quando submetidos à dose de 3 Gy no 10<sup>o</sup> dia de vida intra-uterina.
  
- b) Verificar a expressão do EGF na odontogênese do primeiro molar superior em camundongos *Mus musculus*, submetidos às radiações ionizantes aos 14, 16 e 18 dias de desenvolvimento pré-natal.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Animais

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Local da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – FOSJC/UNESP, por meio do protocolo nº 028/2006-PA/CEP (Anexos A e B). A pesquisa foi realizada no CEBAPE (Centro de Biociências Aplicado a Pacientes Com Necessidades Especiais - FOSJC/UNESP), e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo forneceu apoio financeiro (Processo FAPESP nº 2008/54534-8).

Foram utilizadas 18 camundongos fêmeas prenhes, da raça Swiss, com 60 dias de idade e peso em cerca de 30-40g ao início das experiências. Após verificação da prenhez, as fêmeas foram divididas, aleatoriamente, em 2 grupos:

- a) Grupo controle (C) - Formado de 09 animais sem irradiação;
- b) Grupo Irrradiado (3Gy) - Formado de 09 animais submetidos a um feixe linear de elétrons na dose única de 3 Gy no 10º dia da gestação.

Das mães de ambos os grupos foram separados aleatoriamente 5 embriões por ninhada, para estudo da odontogênese. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOSJC/UNESP). As mães foram colocadas em gaiolas individuais e alimentadas com dieta labina balanceada (GUABI, - Guabi nutrilabor para ratos e camundongos) e água *ad libidum*.

## 4.2 Dosimetria

Para efeitos de cálculo da dose de radioterapia, experiência piloto foi realizada com três camundongos fêmeas. Dosímetros termoluminescentes de sulfato de cálcio dotados com disprósio ( $\text{CaSO}_4:\text{Dy}$ ), na forma de pastilhas, com pequeno volume (Figura 3A) foram utilizados para as medidas de dose.

Os espécimes foram irradiados individualmente utilizando-se acelerador linear de elétrons (marca Siemens<sup>®</sup>, modelo Mevatron-MXE), e a calibração da dose absorvida pelos dosímetros foi feita previamente, para a faixa de dose a ser utilizada no trabalho, em um campo de radiação conhecido, com o mesmo espectro de energia. Assim, obteve-se um fator de calibração que relaciona a área do segundo pico com a dose de radiação recebida pelos dosímetros que foram utilizados nas medidas.

A distribuição de dose ao longo da profundidade do bólus foi feita com as pastilhas TLD, colocadas entre as camadas deste material juntamente com a medida da dose pela câmara de ionização da clínica num ponto interno para intercomparação e normatização com os parâmetros de ajuste do acelerador.

Para atingir a condição de equilíbrio eletrônico, na região de interesse foram utilizadas algumas camadas de bólus depositadas recobrimo toda a região ventral do animal (Figura 3B). A irradiação dos animais foi no abdômen com incidência antero-posterior (Figura 3C).

Para a adequada avaliação da relação efeito biológico versus dose, se faz necessária uma medida da dose absorvida no local de interesse do corpo irradiado. Numa irradiação por feixe colimado, como é o caso da irradiação do abdômen dos camundongos (fêmeas gestantes) deste trabalho, a dose absorvida, a partir da superfície, cresce com a profundidade do corpo atravessado pela radiação, até atingir um ponto

máximo (ponto de equilíbrio eletrônico) e depois decresce monotonicamente (Federico, 2002; Scaff, 1997). Além disso, foi de interesse avaliar a dose nas demais partes do corpo da cobaia onde não há incidência do feixe primário.

A região de máxima dose deve coincidir com a posição dos embriões no interior do ventre do espécime irradiado (Figura 3D). Esta situação, além de ser a mais favorável para obtenção dos resultados pretendidos, estando em condição de equilíbrio eletrônico, permite a adequada avaliação da dose a partir de medidas da dose de entrada no corpo irradiado.

Posteriormente a dosimetria foi confirmada com a utilização de câmara Farmer, equipamento de uso comum em clínicas de radioterapia (Figuras 3E e 3F).

### **4.3 Técnica de radioterapia**

Como a formação do primeiro molar superior do *Mus musculus* começa no 12<sup>o</sup> dia de vida intra-uterina, fêmeas prenhes foram submetidas a uma única dose localizada de 3 Gy de radiação no abdômen ao 10<sup>o</sup> dia de gestação. A partir do 14<sup>o</sup> dia de gestação os animais foram sacrificados e os embriões foram utilizados em três períodos de observação.

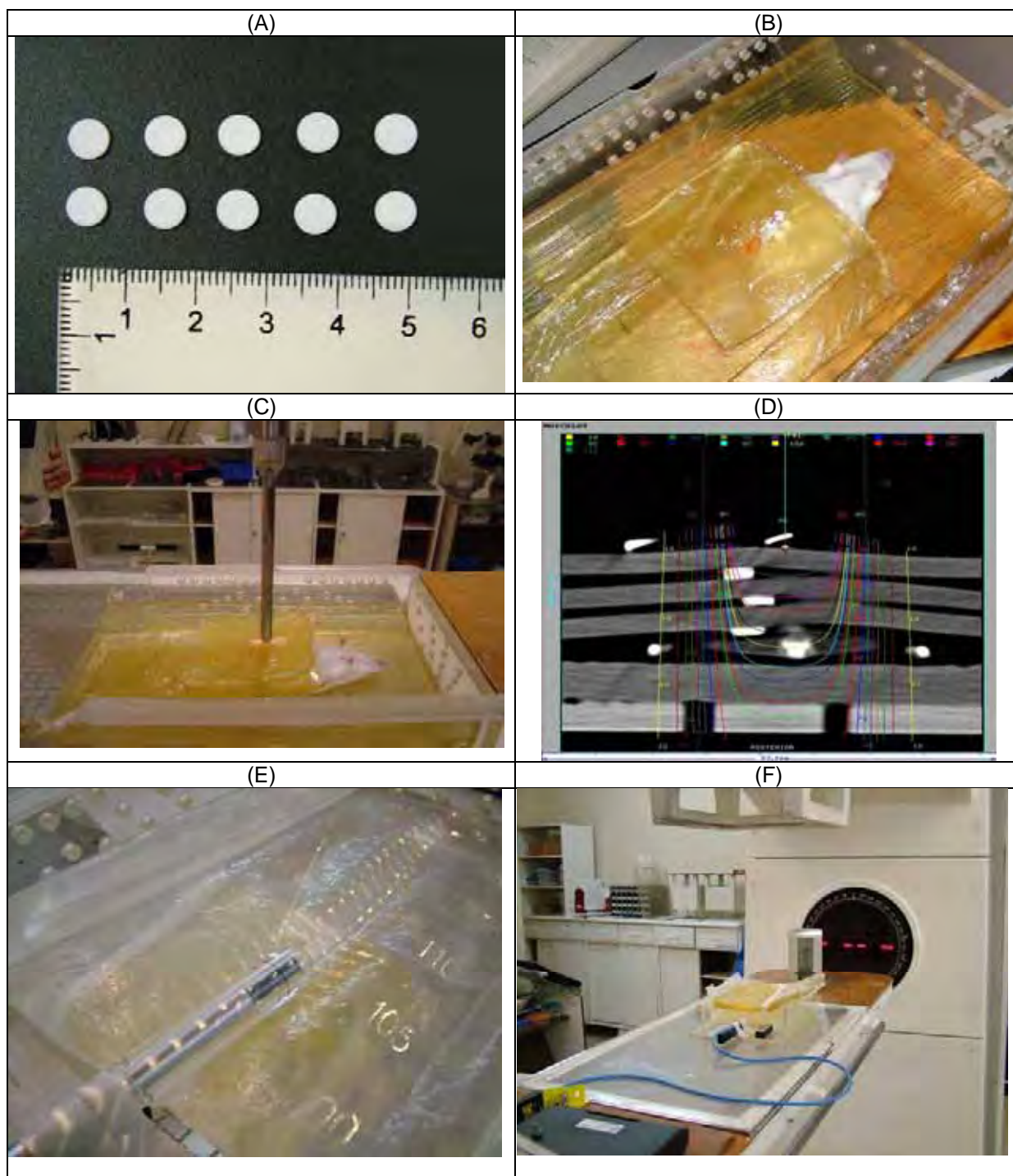


Figura 3 – Pastilhas TLD fornecidas pelo Laboratório de Dosimetria Termoluminescente do Instituto de Estudos Avançados do CTA (A). Animal a ser irradiado sob varias camadas de bólus e dosímetros (B). Animal em posição de irradiação (C). Medida da dose absorvida (D). Câmara Farmer (E). Irradiação da câmara Farmer (F).

#### **4.4 Cesariana e preparo dos embriões para histologia**

Após diagnóstico positivo de prenhez, aos 14<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> dias da gestação, os animais foram submetidos à cirurgia de cesariana, sendo anestesiados com cloridrato de ketamina (4mg/kg) associado ao cloridrato de 2-(2,6-xilidino) – 5,6-dihidro-4h-1,3-tiazina (10mg/Kg). Em seguida, cada animal foi colocado em decúbito dorsal e fixado pelas patas, realizando-se incisão abdominal na linha mediana, de 3 a 4 cm, próximo ao apêndice xifóide. Por compressão do abdômen ocorreu exposição dos cornos uterinos e foram retirados 5 embriões de cada mãe. Os embriões foram limpos, secos em papel de filtro e sacrificados. No 14<sup>o</sup> dia, os mesmos foram colocados inteiros em formol a 10 % por 48 horas, lavados com água corrente por 4 horas e posteriormente colocados em álcool 70<sup>o</sup>C por 6 horas, processados e preparados para o estudo das reações de imuno-histoquímica. Nos 16<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> dias de desenvolvimento pré-natal somente as cabeças foram processadas, devido ao rápido crescimento dos animais. Parte de suas maxilas que contém as porções correspondentes aos germes dentários dos primeiros molares superiores foram processadas e submetidas aos procedimentos de imuno-histoquímica.

#### **4.5 Imuno-histoquímica**

##### **4.5.1 Processamento das peças histológicas para reações de imuno-histoquímica**

Após fixação, as peças dos embriões foram seccionadas no plano mediano, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol no processador automático Leica<sup>®</sup> modelo TP1020 e incluídas em paraplast (Erv-Plast<sup>®</sup>) para confecção de preparados histológicos. As peças foram cortadas em micrótomo da marca Leica<sup>®</sup> modelo RM2255, obtendo-se cortes histológicos com espessura de 3  $\mu\text{m}$ , montadas em lâminas silanizadas da marca Knitell<sup>®</sup>, para posteriormente serem submetidas às reações de imuno-histoquímica.

#### 4.5.2 Técnica de imuno-histoquímica

Os cortes histológicos foram colocadas em placa aquecedora, Marconi<sup>®</sup> modelo MA 038 à 60 °C por 30 min. A desparafinização foi realizada na seguinte seqüência: xilol por 10 min (2 vezes); álcool absoluto, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70% (5 min cada) e lavagem em água destilada por 5 min.

No bloqueio da peroxidase endógena foi utilizada  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 1% por 30 min. Após irrigação e lavagem com Tris<sup>®</sup> por 5 min, os cortes foram mantidos em tris/triton por 15 min, e posteriormente nova lavagem com Tris<sup>®</sup>.

As lâminas foram incubadas no anticorpo primário anticorpo “Anti-mouse EGF”, produto número E2635 da SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>, também no escuro, com uma concentração de 1:250 por cerca de 2:00 h e logo após, dois banhos seguidos com Tris<sup>®</sup>. Os controles negativos permaneceram no Tris, sem incubação com o anticorpo primário.

O kit LSAB+ Sys, HRP<sup>®</sup>, produto código K0690-1 da DAKO<sup>®</sup> foi utilizado como anticorpo secundário, sendo sua incubação em

duas etapas de 10 min em temperatura ambiente com banhos de Tris<sup>®</sup> por 5 min após cada etapa. Diaminobenzidina (DAB) foi aplicada, permanecendo por cerca de 1 min; lavagem com água deionizada (2 vezes). A contra-coloração foi realizada utilizando-se a seguinte técnica: hematoxilina por 5s e lavagem com água deionizada. A desidratação foi realizada na seguinte seqüência: álcool 70% (5 min); álcool 80% (5 min); álcool 90%(5 min); álcool absoluto (5 min); xilol (5 min), onde as lâminas permaneceram até serem montadas com lamínulas e Entelan<sup>®</sup> para leitura em microscópio óptico da marca Leica<sup>®</sup> modelo DME.

## **4.6 Análise Imuno-histoquímica**

### **4.6.1 Leitura das lâminas**

A leitura das lâminas foi realizada por somente um analisador. As lâminas marcadas com EGF coradas pela reação imuno-histoquímica foram analisadas qualitativamente pela microscopia óptica. A leitura e as fotografias das lâminas foram realizadas em um aparelho da Marca Zeiss<sup>®</sup>, modelo Axioskop 40 e com uma máquina fotográfica da marca Zeiss<sup>®</sup>, modelo AxioCam MRc5 acoplada ao microscópio. O software utilizado foi Axiovision 4.6.

Como o EGF foi primeiramente isolado a partir de um extrato obtido das glândulas salivares submandibulares de camundongos, por Levi-Montalcini e Cohen (1960), utilizamos cortes das mesmas para controle positivo e posteriormente para a confecção de um escore padrão para imuno-histoquímica. Foram avaliados os ductos estriados e excretores, assim como os ácinos glandulares. A classificação foi em quatro níveis: ausente, fraco, moderado e intenso (Quadro 1). A análise

imuno-histoquímica dos cortes histológicos foi realizada na camada mais periférica do epitélio que interage com as células ectomesenquimais do germe dentário.

Quadro 1 – Escore padrão para imuno-histoquímica

Marcação	Padrão ou Arranjo
Intenso ou forte (+++)	Contínuo Descontínuo
Moderado (++)	
Fraco (+)	
Ausente (-)	

#### 4.6.2 Análise Histomorfométrica

Foi utilizado o método estereológico, que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas de cortes histológicos. O método baseia-se em princípios geométrico-estatísticos, derivado da probabilidade das imagens das estruturas nos cortes histológicos coincidirem com um sistema-teste apropriado. Deste modo, a característica principal do método está no aspecto casual das amostras, eliminando a ocorrência de vícios na amostragem. É imprescindível a escolha aleatória em todos os estágios do experimento, como: seleção dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas e cortes histológicos e campos microscópicos. Esta metodologia foi aplicada nos cortes histológicos imunorreativos para EGF com intensidade variável.

Na análise histomorfométrica, obtiveram-se 10 lâminas/animal. Dentre essas lâminas, duas foram submetidas à técnica imuno-histoquímica e três cortes histológicos foram analisados aleatoriamente. Para cada corte, foram ainda mensurados três campos

histológicos (Figura 4A e Anexos C, D e E). Estes campos foram mensurados pelo programa Axiovision 4.6 (Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Carl Zeiss, Alemanha). Para o procedimento de mensuração, foi utilizada a objetiva 40x/0,65 (ACHROPLAN, Carl Zeiss) e ocular 10x (W-PI, Carl Zeiss) de um microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens dos campos foram captadas por uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Alemanha), correspondendo a área de 219x163  $\mu\text{m}^2$ . Para análise histomorfométrica, foi mensurado o número de células epiteliais periféricas do órgão do esmalte imunopositivas para EGF, que interagem com as células do ectomesênquima (Figura 4B), dos grupos controle e irradiados (3 Gy) nos períodos de 14<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> dia de desenvolvimento pré-natal.

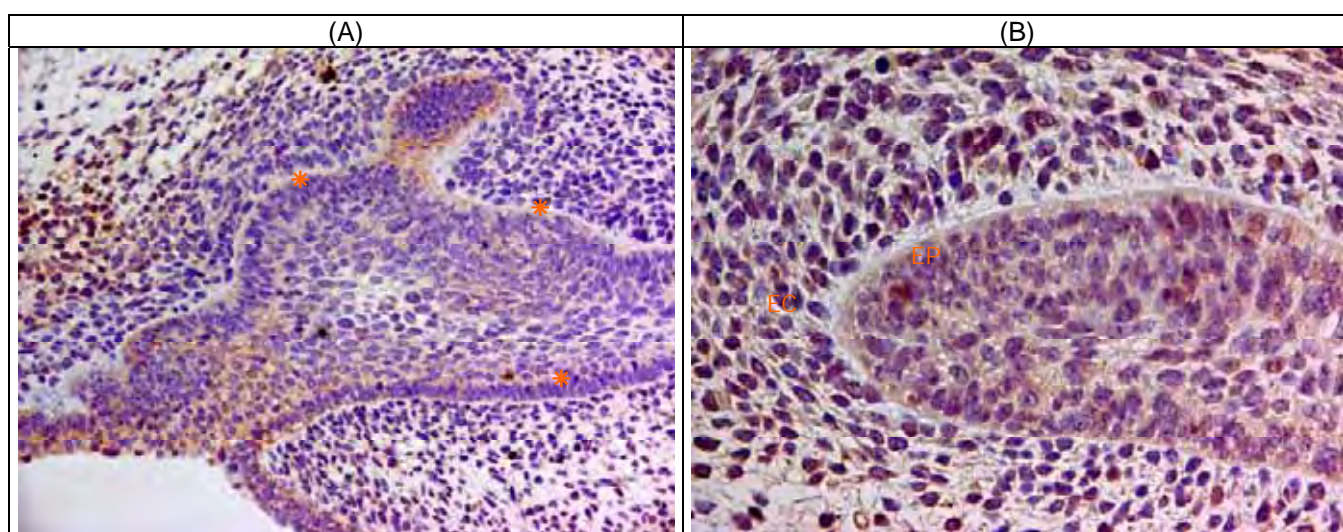


Figura 4 – Fotomicrografia de germe dentário em fase de capuz indicando campos histológicos para a histomorfometria (A) 200x. Fotomicrografia mostrando interação das células epiteliais periféricas do órgão do esmalte (EP) imunopositivas para EGF, que interagem com as células do ectomesênquima (EC) do germe dentário (B) 400x.

## 5 RESULTADOS

Para melhor compreensão dos aspectos morfológicos apresentados pelos germes dentários, a ocorrência de natimortos foi considerada como parâmetro da influencia da radiação sobre o desenvolvimento embrionário. Os dados de ocorrência são apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 – Distribuição em freqüência absoluta (n) e relativa (%) da ocorrência de mortalidade nos embriões do 14°, 16° e 18° dias pré-natais. Comparação das proporções de vivos e, cada período (teste z da curva normal).

Período	Grupo	Mães	N	Filhotes vivos		Vivos (%)	Z	p
				n	%			
14° dia pré-natal	Controle	M10	18	18	100	100,00	1,44	0,149
		M11	16	16	100			
		M12	14	14	100			
	3 Gy	M13	18	18	100	95,92		
		M14	13	13	100			
		M15	18	16	88,9			
16° dia pré-natal	Controle	M19	10	10	100	90,30	1,66	0,097
		M20	12	10	83,3			
		M21	9	8	88,9			
	3 Gy	M22	12	9	75	75,70		
		M23	12	10	83,3			
		M24	13	9	69,2			
18° dia pré-natal	Controle	M28	12	12	100	100,00	3,86	0,0001*
		M29	12	12	100			
		M30	16	16	100			
	3 Gy	M31	18	18	100	73,80		
		M32	15	4	26,7			
		M33	9	9	100			

\*p<0,05

### 5.1 Análise Histológica

As lâminas de controle positivo (Figuras 5A e 5B) foram realizadas com cortes de glândula salivar submandibular de camundongos adultos.

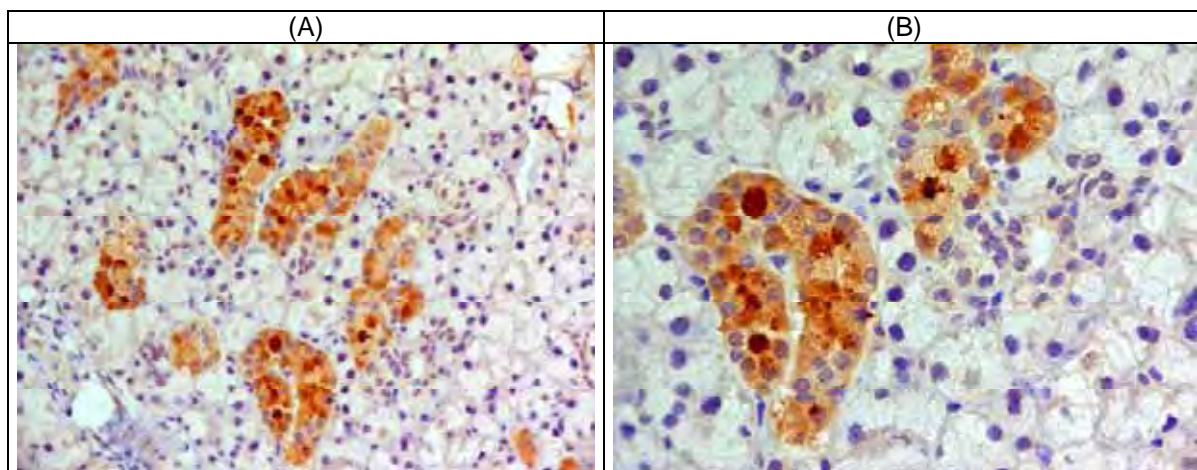


Figura 5 – Fotomicrografia do Controle positivo do EGF (glândula salivar submandibular de camundongo). (A) 200x; (B) 400x.

#### 5.1.1 14<sup>o</sup> dia pré-natal

##### 5.1.1.1 Grupo Controle

Todos os molares superiores do grupo controle apresentaram-se na fase de broto ou botão da odontogênese (Quadro 2). Observou-se espessamento do epitélio, que apresentou várias camadas celulares que adentram pelo ectomesênquima, que por sua vez se apresentou com aspecto bastante celular, organizado e diferenciado. As células basais se mostraram colunares ou cilíndricas baixas, com núcleos alongados. Em três casos a invaginação epitelial ocorreu de forma mais profunda (Figuras 6A e 6B).

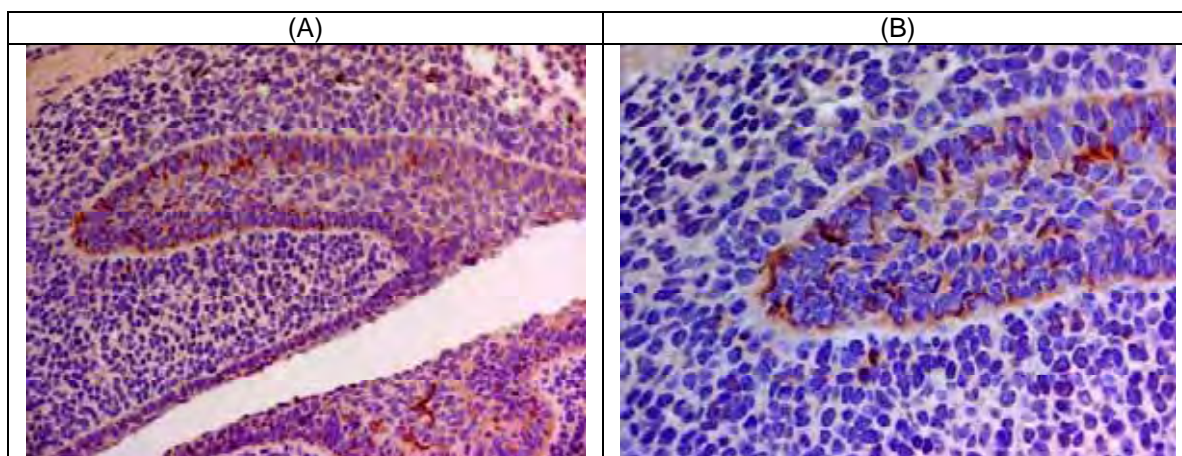


Figura 6 – Fotomicrografia do germe dentário na fase de botão mostrando a expressão moderada do EGF no órgão do esmalte e fraca no ectomesênquima. (A) 200x; (B) 400x.

Quanto à expressão do EGF nas células do órgão do esmalte, foi observada uma marcação moderada na maioria dos germes estudados (Figuras 6A e 6B e Quadro 2). A expressão deste anticorpo nas células ectomesenquimatosas apresentou-se fraca dos germes analisados, sendo ausente em 1 espécime.

Quadro 2 – Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo controle (14<sup>o</sup> dia pré-natal).

Animais	Fase	Epitélio		Ectomesênquima	
		Marcação	Padrão	Marcação	Padrão
M10F1	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M10F2	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M10F3	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M10F4	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M10F5	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M11F1	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M11F2	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M11F3	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M11F4	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M11F5	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M12F1	Botão	++	Disperso	-	Ausente
M12F2	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M12F3	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M12F4	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M12F5	Botão	++	Contínuo	+	Disperso

### 5.1.1.2 Grupo 3 Gy

A maior parte dos germes dentários avaliados do grupo 3 Gy apresentaram os primeiros molares superiores na fase de botão, porém com menor invaginação das células ectodérmicas (Figuras 7A e Quadro 3). Em alguns casos os germes dentários ainda se encontravam na fase de formação da banda epitelial primária (Figura 7B). Com relação à expressão de EGF, alguns apresentaram marcação moderada no epitélio, enquanto a maioria apresentou fraca marcação. Com relação ao ectomesênquima todos apresentaram marcação fraca e padrão disperso (Quadro 3).

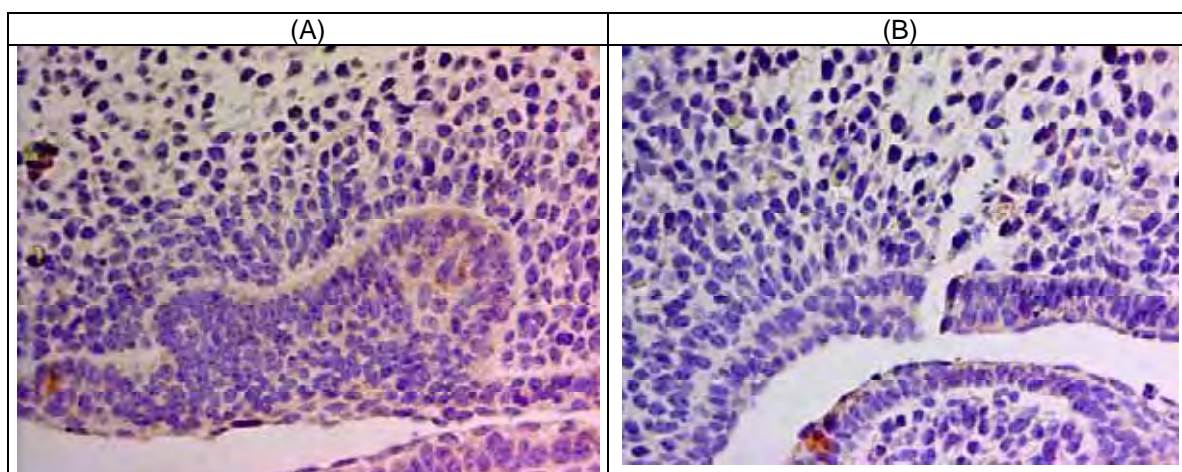


Figura 7 – Fotomicrografia do germe dentário na fase de botão mostrando a expressão moderada de EGF no epitélio e fraca no ectomesênquima (A) 400x.  
Fotomicrografia do germe dentário na fase de banda epitelial primária mostrando a expressão fraca de EGF no epitélio e fraca no ectomesênquima (B) 400x.

Quadro 3 – Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo 3 Gy (14<sup>o</sup> dia pré-natal).

Animais	Fase	Epitélio		Ectomesênquima	
		Marcação	Padrão	Marcação	Padrão
M13F1	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M13F2	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M13F3	Banda epitelial primária	++	Contínuo	+	Disperso
M13F4	Banda epitelial primária	+	Contínuo	+	Disperso
M13F5	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M14F1	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M14F2	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M14F3	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M14F4	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M14F5	Banda epitelial primária	+	Contínuo	+	Disperso
M15F1	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M15F2	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M15F3	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M15F4	Botão	+	Contínuo	+	Disperso
M15F5	Botão	+	Contínuo	+	Disperso

## 5.1.2 16<sup>o</sup> dia pré-natal

### 5.1.2.1 Grupo Controle

Todos os germes dos primeiros molares superiores do grupo controle encontravam-se na fase de capuz. A presença da curvatura cervical e de invaginação do epitélio interno do órgão do esmalte caracterizam esta fase. As células epiteliais basais periféricas eram colunares, e no interior do órgão dentário foi possível constatar a presença, embora escassa, de matriz intersticial entre as células poliédricas. O ectomesênquima apresentava-se ricamente celular organizado principalmente na face voltada para o interior da papila dentária (Figura 8A e Quadro 4).

Em todos os germes dentários foi observada expressão fraca do EGF com padrão disperso no epitélio interno, entretanto moderada na região da curvatura cervical, onde ocorre intensa

proliferação celular ectodérmica (Figura 8B). O ectomesênquima na maioria dos casos apresentou o mesmo padrão de expressão, fraco e disperso, enquanto em alguns poucos não houve expressão (Quadro 4).

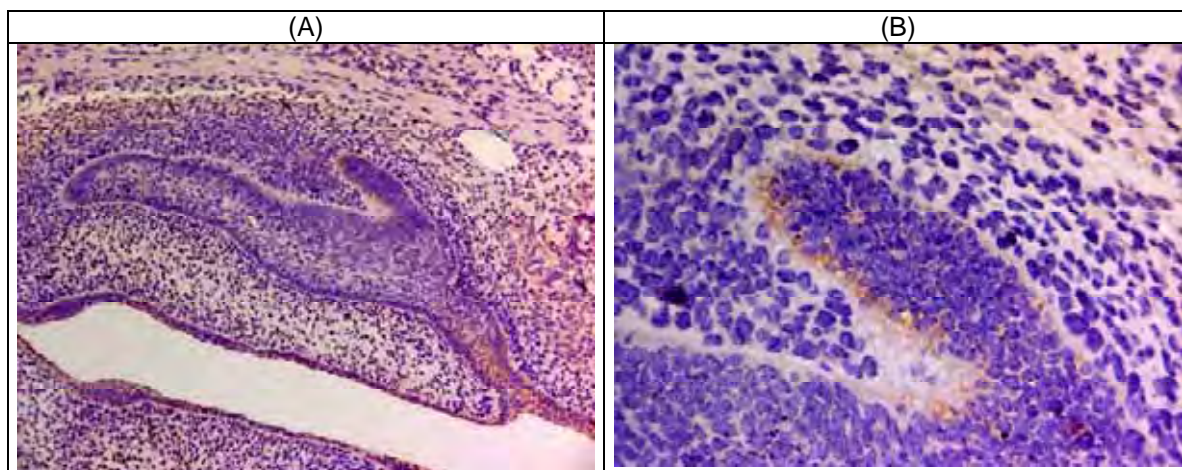


Figura 8 – Fotomicrografia do germe dentário na fase de capuz mostrando a expressão fraca de EGF no epitélio e no ectomesênquima (A) 100x. Detalhe da curvatura cervical expressando EGF de forma moderada (B) 400x.

Quadro 4 – Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo controle (16<sup>o</sup> dia pré-natal).

Animais	Fase	Epitélio		Ectomesênquima	
		Marcação	Padrão	Marcação	Padrão
M19F1	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M19F2	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M19F3	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M19F4	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M19F5	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M20F1	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M20F2	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M20F3	Capuz	+	Contínuo	-	Ausente
M20F4	Capuz	+	Contínuo	-	Ausente
M20F5	Capuz	+	Contínuo	-	Ausente
M21F1	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M21F2	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M21F3	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M21F4	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M21F5	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso

### 5.1.2.2 Grupo 3 Gy

Neste grupo, a maioria dos germes dentários apresentou intensa desorganização e falta de identificação das camadas, caracterizando degeneração celular do ectoderma e ectomesênquima (Figura 9A e Quadro 5). Entretanto alguns poucos se apresentaram com aspecto morfológico variável entre a fase de botão e de capuz (Figura 9B, 9C e 9D).

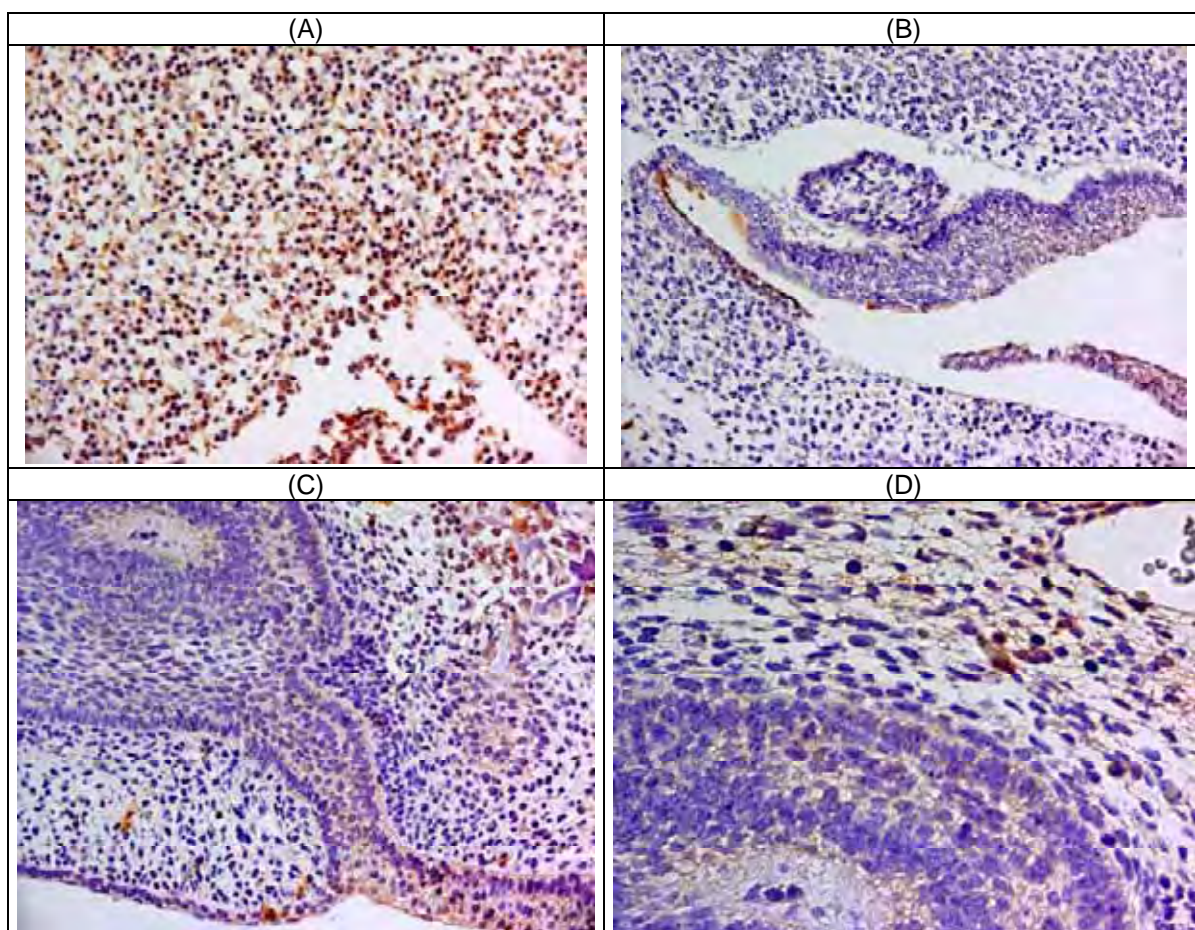


Figura 9 – Fotomicrografia da área do germe dentário com degeneração celular e expressão moderada de EGF no epitélio e no ectomesênquima (A) 200x. Fotomicrografia do germe dentário na fase de botão (B) 200x. Fotomicrografia do germe dentário na fase de capuz mostrando a expressão fraca de EGF no epitélio e no ectomesênquima (C) 200x; (D) 400x.

Com relação à expressão de EGF, foi observado que os germes com maior alteração celular apresentaram marcação moderada, mais evidente na região do epitélio, enquanto que os menos afetados apresentaram expressão deste anticorpo de forma fraca no epitélio interno (Figura 9D e Quadro 5). Nestes casos o ectomesênquima apresentou expressão fraca e dispersa.

Quadro 5 – Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo 3 Gy (16<sup>o</sup> dia pré-natal).

Animais	Fase	Epitélio		Ectomesênquima	
		Marcação	Padrão	Marcação	Padrão
M22F1	Degeneração	++	Disperso	++	Disperso
M22F2	Degeneração	+	Disperso	+	Disperso
M22F3	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M22F4	Degeneração	++	Disperso	+	Disperso
M22F5	Degeneração	++	Disperso	+	Disperso
M23F1	Botão	+	Disperso	+	Disperso
M23F2	Degeneração	++	Disperso	+	Disperso
M23F3	Degeneração	+	Disperso	+	Disperso
M23F4	Degeneração	++	Disperso	+	Disperso
M23F5	Degeneração	+	Disperso	+	Disperso
M24F1	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M24F2	Botão	++	Contínuo	+	Disperso
M24F3	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M24F5	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso
M24F7	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso

### 5.1.3 18<sup>o</sup> dia pré-natal

#### 5.1.3.1 Grupo Controle

Neste grupo, todos os germes apresentaram o órgão dentário característico da fase de campânula (Quadro 6), com o epitélio interno formado por células colunares que evidenciaram a formação das cúspides já delimitadas. O epitélio dentário externo apresentou células cubóides e a presença do retículo estrelado com seu característico aspecto frouxo mostrou células com longos prolongamentos delimitando

amplios espaços intercelulares. Externamente observou-se a presença do folículo dentário envolvendo totalmente o germe dentário, bem como a presença de pequenos núcleos de formação óssea.

Quadro 6 – Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo controle (18<sup>o</sup> dia pré-natal).

Animais	Fase	Epitélio Interno		Papila Dentária	
		Marcação	Padrão	Marcação	Padrão
M28F1	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M28F2	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M28F3	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M28F4	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M28F5	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M29F1	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M29F2	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M29F3	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M29F5	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M29F6	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M30F1	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M30F2	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M30F4	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M30F5	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M30F6	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso

A avaliação imuno-histoquímica para o EGF demonstrou a ocorrência de expressão fraca e contínua no epitélio interno, e fraca, porém dispersa na papila dentária (Figuras 10A e 10B ).

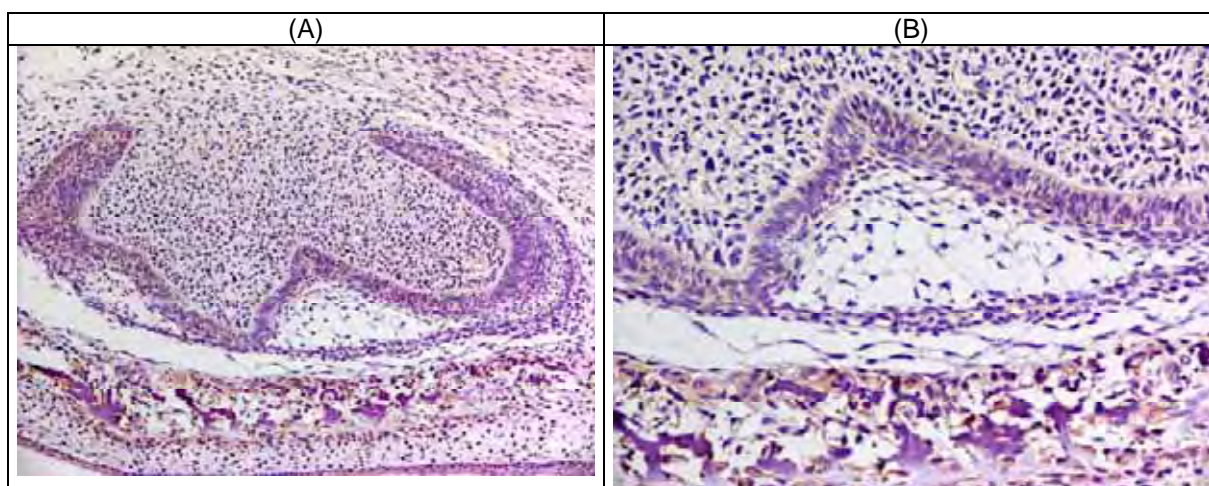


Figura 10 – Fotomicrografia do germe dentário na fase de campânula mostrando a expressão fraca de EGF no epitélio e no ectomesênquima (A) 100x; (B) 200x.

## 5.1.3.2 Grupo 3 Gy

A maioria dos germes do primeiro molar superior apresentava-se em fase de campânula com seus componentes ectodérmicos e ectomesenquimais bem desenvolvidos (Figura 11A e Quadro 7). Entretanto em um caso o germe encontrava-se na fase de capuz (Figura 11C), enquanto outro apresentou aspectos de degeneração celular (Figura 11B).

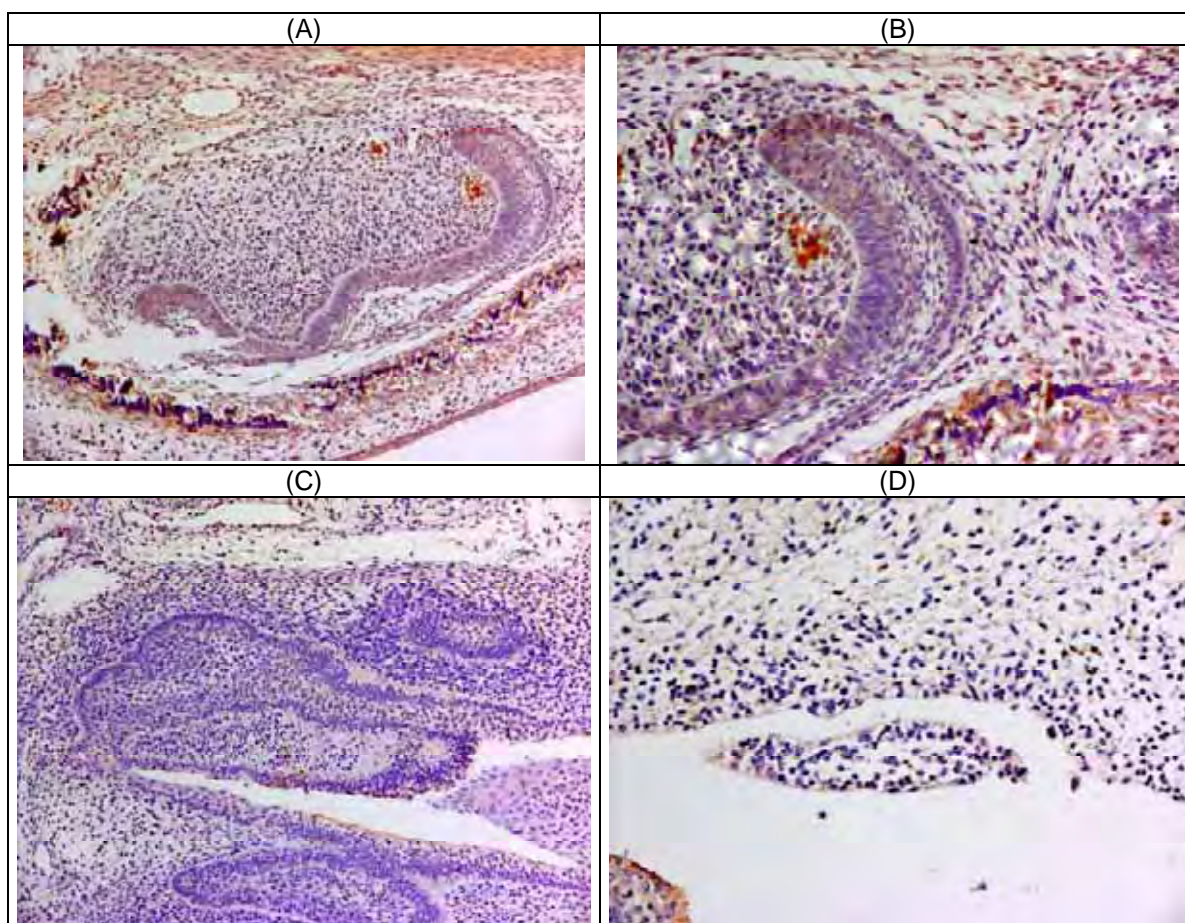


Figura 11 – Fotomicrografia do germe dentário do grupo 3Gy na fase de campânula (A) 100x; (B) 200x.  
Fotomicrografia do germe dentário na fase de capuz (C) 100x.  
Fotomicrografia do germe dentário apresentando degeneração (D) 400x.

A expressão de EGF nos germes morfológicamente definidos em campânula e capuz mostrou marcação fraca e contínua no epitélio dentário interno, e fraca e dispersa na papila dentária (Quadro 7). O germe dentário em degeneração mostrou uma marcação fraca e dispersa.

Quadro 7 – Expressão de EGF no germe dentário dos animais do grupo 3 Gy (18° dia pré-natal).

Animais	Fase	Epitélio Interno		Papila Dentária	
		Marcação	Padrão	Marcação	Padrão
M31F1	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M31F2	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M31F3	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M31F4	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M31F5	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M32F1	Campânula	++	Contínuo	+	Disperso
M32F2	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M32F3	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M32F4	Degeneração	+	Disperso	+	Disperso
M33F1	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M33F3	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M33F4	Campânula	+	Contínuo	+	Disperso
M33F5	Campânula	++	Contínuo	+	Disperso
M33F9	Capuz	+	Contínuo	+	Disperso

## 5.2 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada para quantificar o número de células epiteliais periféricas do órgão do esmalte imunopositivas para o EGF nos animais do grupo controle e grupo 3 Gy (Figura 12).

Para comparar os grupos em cada período de avaliação foi efetuado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Verificou-se que, para o período de 14 dias, a distribuição dos valores do grupo controle (mediana; média  $\pm$  desvio padrão: 59,20; 57,57  $\pm$  8,28) superou a do grupo experimental (18,10; 21,01  $\pm$  12,95). Verificou-se que, para o período de 16 dias, a distribuição dos valores do Controle (mediana;

média  $\pm$  desvio padrão: 60,30; 61,54  $\pm$  5,55) superou a do grupo experimental (7,10; 22,59  $\pm$  23,19). Verificou-se que, para o período de 18 dias, a distribuição dos valores do Controle (mediana; média  $\pm$  desvio padrão: 51,50; 52,173  $\pm$  2,964) superou do grupo experimental (47,40; 44,36  $\pm$  11,47). Essas diferenças foram estaticamente significantes. Os resultados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, e mostraram que o número de células epiteliais foi significativamente menor no grupo 3 Gy em relação ao grupo 3 controle nos períodos de 14<sup>o</sup> ( $P < 0,0001$ ), 16<sup>o</sup> ( $P < 0,0001 < 0,05$ ) e 18<sup>o</sup> ( $P < 0,0008$ ) dias pré-natais (Tabela 2 e Anexo F).

Tabela 2 – Estatística descritiva e resultado do teste de Mann-Whitney na comparação dos grupos segundo os três períodos

Estatística	14 <sup>o</sup> dia		16 <sup>o</sup> dia		18 <sup>o</sup> dia	
	C	3Gy	C	3Gy	C	3Gy
n	15	15	15	15	15	14
Média	57,57	21,01	61,54	22,59	52,173	44,36
Desvio padrão	8,28	12,95	5,55	23,19	2,964	11,47
Coef. Var. (%)	14,39	61,64	9,02	102,66	5,68	25,85
Mínimo	42,60	8,70	53,80	3,60	45,80	6,60
25 <sup>o</sup> Percentil	53,10	12,50	56,70	5,40	50,40	43,88
Mediana	59,20	18,10	60,30	7,10	51,50	47,40
75 <sup>o</sup> Percentil	63,80	20,0	66,0	51,30	54,80	49,35
Máximo	72,40	51,0	70,30	61,10	56,80	53,20
p-valor	0,0001*		0.00001*		0.0008*	

\* $p < 0,05$

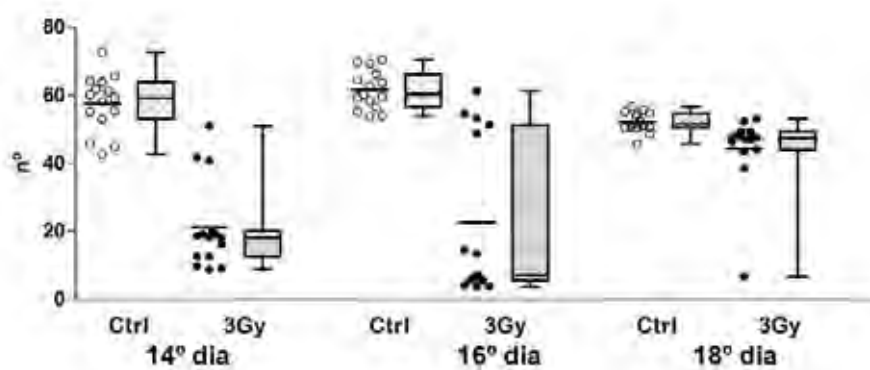


Figura 12 – Representação gráfica da análise histomorfométrica

## 6 DISCUSSÃO

O cenário científico mundial se modificou de forma acentuada no período final do século XIX e início do século XX a partir da descoberta dos raios X e do isolamento de elementos químicos radioativos. Assim, várias aplicações foram criadas dentro das áreas biomédicas, seja como ferramenta para o diagnóstico, ou para tratamento de lesões malignas. Entretanto, as radiações ionizantes foram utilizadas inicialmente de forma abusiva, e isso acarretou o aparecimento de efeitos biológicos, nos indivíduos expostos, de alterações prejudiciais ao organismo.

O advento de equipamentos para radioterapia dotados de aceleradores lineares de elétrons representa grande evolução nos tratamentos radioterápicos. Elementos químicos radioativos já não são necessários na sua operação, e com isso aumenta a precisão e a segurança dos pacientes e operadores. A possibilidade de acidentes nucleares é nula.

As clínicas de radioterapia possuem protocolos de dosimetria bem estabelecidos para o corpo humano ou partes dele. Suas medidas são realizadas com câmaras de ionização e fantomas de água ou de material tecido-equivalente. Entretanto esses protocolos e respectivos cálculos de curvas de isodose poderiam não ser adequados e suficientemente precisos para os corpos de pequeno volume dos camundongos irradiados nesta pesquisa (aproximadamente 25 cm<sup>3</sup>) (Hindorf et al. 2004). Verificou-se que tanto a utilização de pastilhas TLD, quanto da câmara Farmer apresentaram precisão equivalente para a dose de 3 Gy, apesar das pastilhas TLD serem consideradas por profissionais da física o método com maior valor científico, por ser método direto.

O corpo humano apresenta cerca de 200 tipos celulares diferentes, com características morfológicas variáveis entre si. Quanto mais a célula se apresenta diferenciada em seu desenvolvimento, mais ela é resistente aos efeitos deletérios das radiações ionizantes. Células que apresentam ciclo celular curto, caracterizando intensa proliferação, são extremamente sensíveis às radiações. Isso ocorre principalmente com aquelas que compõem os tumores malignos.

Quanto mais cedo o indivíduo é submetido ao tratamento radioterápico mais efeitos biológicos poderá apresentar. Desta maneira, alterações nos elementos dentários podem surgir, uma vez que as mesmas moléculas reguladoras do seu desenvolvimento, consideradas “moléculas alvo” da radioterapia, também estão envolvidas com o crescimento de neoplasias na região crânio-facial, quando em desequilíbrio (McGinnis et al., 1987; Takeda et al., 1987; Dahllöf et al., 1988; Tajima et al., 1992; Dahllöf et al., 1994; Takinami et al., 1994; Huber; Terezhalmay, 2003; Hubbard, 2006).

Foi feita a opção pelo estudo do EGF, pois é um fator de crescimento que tem sido descrito como um regulador natural da formação dentária, estimulando a proliferação de células epiteliais e ectomesenquimais, assim como afetando outras funções celulares como a síntese de macromoléculas e a reabsorção óssea (Wise et al., 1992; Lin et al. 1996; Shroff et al., 1996; Peixoto et al., 2003). EGF e EGFR podem estar envolvidos também com a regeneração de tecidos submetidos à radiação (Lindgaard et al., 1997; Epstein et al., 1997; Ruifrok et al., 1997; Dumbrigue et al., 2000; Bussink et al., 2007).

O modelo biológico aqui utilizado justifica-se por ser amplamente estudado, tanto no que diz respeito à odontogênese quanto aos efeitos biológicos da radiação (Lacassagne, 1940; Levi-Montalcini; Cohen, 1960; Gartner et al., 1977; Ruifrok et al., 1997; Dainiak, 2002; Peixoto et al., 2003). Outro fator importante foi a grande disponibilidade

de anticorpos primários específicos no mercado, o que permitiu planejar sólida linha de pesquisa.

A irradiação ocorreu no décimo dia de gestação, período relativamente próximo ao início da odontogênese, permitindo, desta forma avaliar alterações gradativas dos efeitos biológicos nestas estruturas.

Durante os primeiros procedimentos cirúrgicos constatou-se considerável taxa de mortalidade entre as ninhadas, e estes dados foram coletados e compilados para melhor compreensão dos aspectos morfológicos apresentados pelos espécimes que resistiram à radiação (Tabela 1 e Anexo G).

A taxa de sobrevivência do grupo controle mantém-se a mesma com o decorrer do tempo (do 14<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia). Por outro lado, no grupo 3 Gy, o aumento do tempo acarreta uma diminuição da taxa de sobrevivência. Essa diminuição, em relação ao controle, é mais sensível no último dia experimental.

No grupo Controle do 14<sup>o</sup> dia a taxa de sobrevivência foi de 100%. Apenas uma das três famílias do grupo 3 Gy apresentou natimortos e a taxa de sobrevivência foi de 95,92%. No 16<sup>o</sup> dia, a taxa de sobrevivência do grupo controle (90,30%) foi superior à taxa do grupo 3 Gy (75,70%). No 18<sup>o</sup> dia, a taxa de sobrevivência do grupo controle (100,00%) foi superior à taxa do grupo 3 Gy (73,80%). Apenas neste último período a diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 1).

Do ponto de vista histológico, todos os germes dentários do grupo controle no 14<sup>o</sup> dia pré-natal apresentaram-se na fase de botão, em estágios equivalentes (Quadro 2). A expressão de EGF mostrou-se equivalente entre todos os espécimes, com grande número de células expressando de forma moderada e contínua no epitélio, e fraca e dispersa no ectomesênquima.

No grupo 3 Gy do 14<sup>o</sup> dia foi constatado atraso na odontogênese em 20% dos filhotes das famílias avaliadas, quando comparados aos germes dentários do grupo controle. Os efeitos da

radiação na expressão de EGF foram observados principalmente no epitélio, pois neste tecido ocorreu menor marcação, quando comparado ao grupo controle (Quadro 3). O ectomesênquima apresentou resultados semelhantes àqueles apresentados pelo grupo controle. A análise histomorfométrica demonstrou que mesmo os germes dentários do grupo 3 Gy que se encontravam em fase de botão, quando comparados ao grupo controle apresentavam menor número de células epiteliais imunoreativas para o EGF, quando comparadas aos germes do grupo controle (Tabela 2, Figura 12 e Anexo C). Podemos interpretar que o epitélio, que se encontra em fase de intensa atividade proliferativa, é mais susceptível às radiações ionizantes que o ectomesênquima (Peixoto et al., 2003; Chen, 2006).

A avaliação histológica do grupo controle no 16<sup>o</sup> dia pré-natal mostrou todos os germes dentários no mesmo estágio de desenvolvimento na fase de capuz. A expressão de EGF confirmou este achado, por apresentar padrão de marcação equivalente em todos os espécimes, tanto no epitélio quanto no ectomesênquima (Quadro 4).

O grupo 3 Gy do 16<sup>o</sup> dia pré-natal mostrou elevada ocorrência de atraso nos níveis de desenvolvimento, sendo que a maioria dos animais apresentou degeneração aguda, o que acarretou em aumento significativo do desvio padrão (Tabela 2, Figura 12 e Anexo D). Poucos animais apresentaram situação semelhante aos animais do grupo controle, o que sugere maior resistência de alguns espécimes, frente às radiações ionizantes. Epstein et al. (1997) demonstraram que os níveis de concentração de EGF na saliva de pacientes submetidos à radioterapia diminuem durante o tratamento, e Partanen e Thesleff (1987) acreditam que o EGF estimula ou mantém a proliferação de células indiferenciadas durante o desenvolvimento embrionário. Em nossos resultados, a imunohistoquímica demonstrou a tentativa de recuperação por meio do aumento na expressão de EGF (Lindegard et al., 1997; Ruifrok et al., 1997), ainda

que seja limitada pelas evidentes alterações morfológicas tanto no epitélio, quanto no ectomesênquima. Os espécimes mais sensíveis à radiação apresentaram marcação moderada no epitélio (Quadro 5), o que contrasta com a marcação fraca encontrada no epitélio dos germes do grupo controle do 16<sup>o</sup> dia pré-natal. Novamente a análise histomorfométrica demonstraram menor número de células imunoreativas para EGF, quando comparadas ao grupo controle do 16<sup>o</sup> dia pré-natal, inclusive nos espécimes que também se encontravam em fase de capuz (Tabela 2, Figura 12 e Anexo E).

Assim como ocorreu nos períodos anteriores, todos os espécimes do grupo controle no 18<sup>o</sup> dia apresentaram sintonia no que diz respeito à fase da odontogênese em que se encontravam (campânula). A expressão de EGF foi também equivalente em todos os germes dentários, tanto no epitélio interno, quanto na papila dentária (Quadro 6).

A maior parte dos germes dentários do grupo 3 Gy do 18<sup>o</sup> dia apresentou-se em fase de campânula, com características morfológicas e expressão de EGF semelhantes aos padrões do grupo controle (Quadro 7), entretanto, o número de células epiteliais reativas ao EGF foi significativamente menor (Tabela 2 e Figura 12). O animal com degeneração celular apresentou padrão de organização superior aos animais com degeneração do grupo 3 Gy do 16<sup>o</sup> dia pré-natal.

Acredita-se que estes dados sugerem fortemente a capacidade de resistência específica de determinados animais, em detrimento daqueles que morrem. Isto também caracteriza a dose de 3 Gy como capaz de produzir efeitos biológicos estocásticos em camundongos, que deve ser considerado como parâmetro desejável em estudos experimentais.

De acordo com a análise morfológica do grupo controle, a marcação de EGF no epitélio apresentou-se de forma decrescente, pois os espécimes do 14<sup>o</sup> dia pré-natal encontravam-se em intensa fase proliferativa de indução, e no 18<sup>o</sup> dia pré-natal já ocorria a

histomorfodiferenciação dos tecidos. No grupo 3 Gy, todos os períodos mostravam marcação equivalente.

Assim como relatou Chen (2006), o ectomesênquima apresentou-se menos sensível à radiação, por apresentar expressão de EGF semelhante nos grupos experimentais 3 Gy e controle, nos períodos de 14<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> dias pré-natais (Quadros 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

Um maior avanço na compreensão destes mecanismos será possível por meio do estudo de proteínas como o TGF- $\beta_1$  (antagonista do EGF) e VEGF, que participam da angiogênese, osteoclastogênese e osteogênese, fundamentais aos processos de reparação tecidual e odontogênese, e também suscetíveis às radiações ionizantes (Gartner et al., 1977; Lehninger et al., 1995; Volejnikova et al., 1997; Ruifrok et al., 1997; Andarawewa et al., 2007; Bussik et al., 2007; Wise; King, 2008).

## 7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados das análises histomorfológica e histomorfométrica, concluímos que:

- a) As radiações ionizantes podem provocar efeitos biológicos estocásticos na odontogênese de camundongos (*Mus musculus*), quando submetidos à dose de 3 Gy no 10<sup>o</sup> dia de vida intra-uterina, causando degeneração celular;
- b) A expressão de EGF nas células epiteliais mostrou-se maior no 14<sup>o</sup> dia pré-natal e menor nos 16<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> dias pré-natais;
- c) As células ectomesenquimais apresentaram fraca expressão de EGF em todos os grupos estudados, e semelhantes em todos os períodos experimentais;
- d) O número de células epiteliais periféricas do órgão do esmalte imunopositivas para o EGF foi significativamente menor no grupo 3 Gy em relação ao grupo controle nos períodos de 14<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> dias pré-natais.

## REFERÊNCIAS \*

- 1 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
- 2 Andarawewa KL, Paupert J, Pal A, Barcellos-Hoff MH. New rationales for using TGF- $\beta$  inhibitors in radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 2007; 83(11-12):803-11.
- 3 Arana-Chavez VE. Odontogênese. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1997; 51(4):361-6.
- 4 Baumgart CS, Lauxen IS, Sant`Anna Filho M, Quadros OF. Epidermal growth factor receptor distribution in pericoronal follicles: relationship with the origin of odontogenic cysts and tumors. *OOOOE*. 2007; 103(2):240-5.
- 5 Bussink J, Kaanders JHAM, van der Kogel AJ. Microenvironmental transformations by VEGF- and EGF-receptor inhibition and potential implications for responsiveness to radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2007; 82(1):10-7.
- 6 Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem*. 1979; 48:193-216.
- 7 Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*. 1962; 237(5):1555-62.

---

\* Baseado em:

International Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform Requirements for manuscript submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

- 8 Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Develop Biol.* 1965; 12:394-407.
- 9 Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72(4):1317-21.
- 10 Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia estrutural e funcional.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.
- 11 Chen MF. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 2006; 66(1):244-53.
- 12 Dahllöf G, Barr M, Bolme P, Modèer T, Lönnqvist B, Ringdèn O, Heimdahl A. Disturbances in dental development after total body irradiation in bone marrow transplant recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65(1):41-44.
- 13 Dahllöf G, Rozell B, Forsberg CM, Borgström B. Histologic changes in dental morphology induced by high dose chemotherapy and total body irradiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 77(1):56-60.
- 14 Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol.* 2002; 30(6):513-528.
- 15 Demiral AN. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Larynx.* 2004; 31(4): 417-424.
- 16 Derynck R. Transforming Growth factor- $\alpha$ : structure and biological activities. *J Cell Biochem.* 1986; 32:293-304.
- 17 Dumbrigue HB, Sandow PL, Nguyen KHT, Humphreys-Beher MG. Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 89(6):710-16.
- 18 English JA, Schlack CA, Ellinger F. Oral manifestations of ionizing radiation. *J Dent Res.* 1954; 33:377-88.

- 19 Epstein JB, Emerton S, Guglietta A, Le N. Assessment of epidermal growth factor in oral secretions of patients receiving radiation therapy for cancer. *Oral Oncol.* 1997; 33(5):359-63.
- 20 Epstein JB, Gorsky M, Guglietta A, Le N, Sonis ST. The correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. *Cancer.* 2000; 89(11):2258-65.
- 21 Federico CA. Medida do perfil de dose no alumínio irradiado com raios gama de captura de nêutrons térmicos utilizando o dosímetro termoluminescente CaSO<sub>4</sub>:Dy [dissertação]. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo; 2002.
- 22 Gartner LP, Hiatt JL, Provenza DV. Effects of ionizing radiation on incisor development of the prenatal mouse. *Acta Anat.* 1977; 98(4):367-375.
- 23 Grünwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor of cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(12):851-67.
- 24 Hindorf C, Ljungberg m, Strand SE. Evaluation of parameters influencing S values in mouse dosimetry. *J Nucl Med.* 2004; 45(11):1960-65.
- 25 Hubbard SR. EGF receptor activation: push comes to shove. *Cell.* 2006; 125(6):1029-31.
- 26 Huber MA, Terezhalmay T. The head and neck radiation oncology patient. *Quintessence Int* 2003; 34:693-717.
- 27 Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
- 28 Katchburian E, Arana-Chavez VE. *Histologia e Embriologia Oral.* São Paulo: Panamericana; 1999.

- 29 Kronmiller JE. Spatial distribution of epidermal growth factor-transcripts and effects of exogenous epidermal growth factor on the pattern of the mouse dental lamina. *Archs Oral Biol.* 1995; 40(2):137-43.
- 30 Lacassagne A. Dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire chez la souris. *Compt Rend Soc Biol* 1940; 133:180-181.
- 31 Lee SW, Jung KI, Kim YW, Jung HD, Kim HS, Hong JP. Effect of epidermal growth factor against radiotherapy-induced oral mucositis in rats. *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 2007; 67(4):1172-1178.
- 32 Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios da Bioquímica.* São Paulo: Sarvier; 1995.
- 33 Levi-Montalcini R, Cohen S. Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Ann NY Acad Sci.* 1960; 85(85):324-41.
- 34 Lindegaard JC, Vinter-Jensen L, Overgaard J. Epidermal growth factor and acute radiation damage in CDF1 mice *in vivo*. *Acta Odontol.* 1997; 36(4):393-396.
- 35 Lin F, Wise GE. Effect of epidermal growth factor on expression of transforming growth factor-  $\beta_1$  mRNA in stellate reticulum cells of rat mandibular molars. *Dev Dyn.* 1993; 198:22-27.
- 36 Lin F, Zhao L, Wise Ge. *In vivo* and *in vitro* effects of epidermal growth factor in its receptor gene expression in rat dental follicle cells. *Arch Oral Biol.* 1996; 41(5):485-491.
- 37 Lourenço SQC. Apoptose na odontogênese: durante a fragmentação da lâmina dentária e da bainha epitelial de Hertwig e no epitélio reduzido do órgão do esmalte [tese]. Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo; 1997.
- 38 Manzi FR. Efeito da radiação ionizante no desenvolvimento dentário em ratos [tese]. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas; 2005.

- 39 Marquardt H. Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science*. 1984; 223:1079-81.
- 40 McGinnis JP, Hopkins KP, Thompson EI, Hustu O. Mandibular third molar development after mantle radiation in long-term survivors of childhood Hodgkin`s disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987; 63(5):630-33.
- 41 Milano G, Magné N. Anti-REGF et radiothérapie. *Cancer Radiother*. 2004; 8(6):380-82.
- 42 Mjör IA, Fejerskov O. *Embriologia e Histologia oral Humana*. Buenos Aires: Ed Médica Panamericana, 1990.
- 43 Navarro CM, Chan C, Onofre MA, Cordeiro RCL, Raveli DB. Estudo histomorfológico de glândulas submandibulares de rato submetidas a doses baixas de radiação X. *Rev Odontol UNESP*. 1996; 25:259-67.
- 44 Partanen AM, Thesleff I. Localization and quantitation of <sup>125</sup>I-epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Dev Biol*. 1987; 120(1):186-97.
- 45 Peixoto BC, Santos CRR, Canuto CE. The expression of the epidermal growth factor (EGF) during odontogenesis: immunohistochemical study in mice (*Mus musculus*). *Cienc Odontol Bras*. 2003; 6(4):25-31.
- 46 Que B, Wise GE. Colony-stimulating factor-1 and monocyte chemoattractant protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. *Arch Oral Biol*. 1997; 42(12):855-60.
- 47 Que B, Wise GE. Tooth eruption molecules enhance MCP-1 gene expression in the dental follicle of the rat. *Dev Dyn*. 1998; 212(3):346-51.
- 48 Ruch JV. Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *J Dent Res* 1985; 64:489-498.

- 49 Ruifrok AC, Mason KA, Lozano G, Thames HD. Spatial and temporal patterns of expression of epidermal growth factor, Transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 1-3 and their receptors in mouse jejunum after radiation treatment. *Radiat Res.* 1997; 147(1):1-12.
- 50 Scaff LA. Física da Radioterapia. São Paulo: Sarvier; 1997.
- 51 Segreto HRC, Segreto RA. Revisão e atualização em Radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos. *A Folha Médica* 2000; 119:9-27.
- 52 Shroff B, Kashner JE, Keyser JD, Hebert C, Norris K. Epidermal growth and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 1996; 41(6):613-17.
- 53 Tajima Y, Yokose S, Kashimata M, Hiramatsu M, Minami N, Utsumi N. Epidermal growth factor expression in junctional epithelium of the rat gingiva. *J Periodontal Res.* 1992; 27(4):299-300.
- 54 Takeda Y, Kuroda M, Amari E, Yanagisawa T. Failure of root development of human permanent teeth following irradiation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1987; 16(3):376-82.
- 55 Takinami S, Kaga m, Yahata H, Kure A, Oguchi H, Yasuda M. Radiation-induced hypoplasia of the teeth and mandible. A case report *Oral Surg Orl Med Oral Pathol.* 1994; 78(3):382-4.
- 56 Ten Cate AR. Odontoblasts. *J Dent Res.* 1985; 64:549-51.
- 57 Ten Cate AR. *Histologia Bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- 58 Van Der Linden FPGM. *Ortodontia: desenvolvimento da face.* São Paulo: Quintessence; 1986.
- 59 Volejnikova S, Laskari M, Marks SC Jr, Graves DT. Monocyte recruitment and expression of monocyte chemoattractant protein-1 are developmentally regulated in remodeling bone in the mouse. *Am J Pathol.* 1997; 150(5); 1711-21.

- 60 White SC, Pharoah MJ. Radiologia Oral: fundamentos e interpretação. São Paulo: Elsevier; 2007.
- 61 Wise GE, Lin F, Fan W. Localization of Epidermal Growth Factor and its receptor in mandibular molars of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. Dev Dyn. 1992; 195:121-6.
- 62 Wise GE, Lin F. The molecular biology of initiation of tooth eruption. J Den Res. 1995; 74(1):303-06.
- 63 Wise GE, Lin F, Zhao L. Immunolocalization of interleukin-1 $\alpha$  in rat mandibular molars and its enhancement after *in vivo* injection of epidermal growth factor. Cell Tissue Res. 1995a; 280(1):21-6.
- 64 Wise GE, Lin F, Zhao L. Transcription and translation of CSF-1 in the dental follicle. J Dent Res. 1995b; 74(9):1551-57.
- 65 Wise GE, Zhao L. Immunostaining and transcriptional enhancement of interleukin-1 type I in the rat dental follicle. Arch Oral Biol. 1997; 42(5):339-44.
- 66 Wise GE, Zhao L, Grier L. Localization and expression of CSF-1 receptor in rat dental follicle cells. J Den Res. 1997; 77(6):1576-9.
- 67 Wise GE. The biology of tooth eruption. J Den Res. 1998; 77(8):1576-1579.
- 68 Wise GE, Huang H. Synthesis and secretion of MCP-1 by dental follicle cells: implications for tooth eruption. J Den Res. 1999; 78(11):1677-81.
- 69 Wise GE, Que BG, Huang H, Lumpkin SJ. Enhancement of gene expression in rat dental follicle cells by parathyroid hormone-related protein. Arch Oral Biol. 2000; 45(10):903-909.
- 70 Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. J Dent Res. 2008; 87(5):414-434.
- 71 Yang CY, Meng CL. Regulation of PG synthetase by EGF and PDGF in human oral, breast, stomach, and fibrosarcoma cancer cell lines. J Dent Res. 1994; 73(8):1407-1415.

- 72 Yao s, Pan F, Wise GE. Chronological gene expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the stellate reticulum of the rat: implications for tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(3):228-232.
- 73 Zeilstra LJ, Vissink A, Koning AW, Coppes RP. Radiation induced cell loss in rat submandibular gland and its relation to gland function. *Int J Radiat Biol.* 2000; 76(3):419-429.
- 74 Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. Review: the epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Rad Oncol.* 2006; 1:11.

## Anexo A


 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028  
Fax (12) 3947-9010 / suely@fojuc.unesp.br

---

**CERTIFICADO****Comitê de Ética em Pesquisa-Local**

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **028/2006-PA/CEP**, sobre “O efeito dos raios-x na expressão do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGF-R) durante a odontogênese em camundongos (*Mus musculus*)”, sob a responsabilidade de **BRENO CHERFÊN PEIXOTO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 12 de dezembro de 2006.



---

**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
**Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local**


**Anexo B****SOLICITAÇÃO DE ALTERAÇÃO DO NOME DO PROJETO DE TESE**


São José dos Campos, 09 de Maio de 2008.

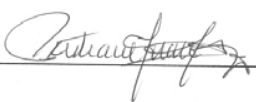
À Coordenação do  
Programa de Pós-graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL

Encaminho em anexo, a alteração do Título do Projeto de Tese de meu orientando BRENO CHERFÊN PEIXOTO, aluno matriculado na Área de RADIOLOGIA ODONTOLÓGICA no curso de DOUTORADO deste Programa, cujo trabalho intitula-se: EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIOTERAPIA NA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGF) E DO RECEPTOR PARA O FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) DURANTE A ODONTOGÊNESE EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*), para aprovação no Conselho.

Atenciosamente,

  
Orientador

Ciente:   
Aluno

Despacho da Coordenação de 18 / 06 / 08   
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Anexo C

Tabela 3 – Análise histomorfométrica - 14º dia pré-natal - Grupos Controle e 3 Gy

<b>Grupo Controle</b>															
Campos	M10F1			M10F2			M10F3			M10F4			M10F5		
1º	45	43	37	45	42	41	43	45	50	44	42	36	42	42	46
2º	47	45	42	79	74	75	88	83	82	57	54	52	80	79	82
3º	43	41	41	42	43	37	34	36	40	41	43	35	41	39	47
Média	42,6			53,1			55,6			44,8			55,3		
Média total	50,28														
Campos	M11F1			M11F2			M11F3			M11F4			M11F5		
1º	30	32	34	50	48	41	49	45	46	46	51	43	53	42	44
2º	72	73	76	95	94	91	84	89	78	92	85	79	92	90	89
3º	31	30	35	46	43	48	41	42	50	44	49	52	42	41	40
Média Total	45,8			61,7			58,2			60,1			59,2		
Média total	57,0														
Campos	M12F1			M12F2			M12F3			M12F4			M12F5		
1º	60	54	52	46	47	42	49	48	54	45	46	43	51	51	69
2º	116	123	101	101	107	100	101	106	99	97	98	85	77	70	89
3º	48	52	46	44	44	47	42	46	46	41	53	42	54	69	45
Média	72,4			64,2			65,6			61,1			63,8		
Média Total	65,42														
<b>Grupo 3 Gy</b>															
Campos	M13F1			M13F2			M13F3			M13F4			M13F5		
1º	0	0	0	27	38	34	0	0	0	0	0	0	33	33	48
2º	58	59	63	76	77	82	24	27	28	28	26	34	41	53	58
3º	0	0	0	44	32	49	0	0	0	0	0	0	36	36	39
Média	20			51,0			8,7			9,7			41,8		
Média Total	26,24														
Campos	M14F1			M14F2			M14F3			M14F4			M14F5		
1º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2º	55	57	60	57	56	59	61	58	49	50	48	47	27	26	28
3º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	19,1			19,1			18,6			16,1			9,0		
Média Total	16,38														
Campos	M15F1			M15F2			M15F3			M15F4			M15F5		
1º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	26	27	0	0	0
2º	54	58	51	57	50	56	39	36	38	71	68	69	40	34	39
3º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	25	26	0	0	0
Média	18,1			18,1			12,5			40,8			12,5		
Média Total	20,4														

## Anexo D

Tabela 4 – Análise histomorfométrica - 16º dia pré-natal - Grupos Controle e 3 Gy

<b>Grupo Controle</b>															
Campos	M19F1			M19F2			M19F3			M19F4			M19F5		
1º	56	48	60	51	49	40	53	66	52	52	54	49	56	50	50
2º	83	71	83	59	59	80	66	74	70	93	88	89	97	106	102
3º	45	47	40	45	49	53	47	43	54	58	60	51	57	57	52
Média	59,2			53,8			58,3			66,0			69,6		
Média Total	61,26														
Campos	M20F1			M20F2			M20F3			M20F4			M20F5		
1º	58	55	55	53	47	48	49	62	50	48	47	45	50	53	54
2º	76	66	71	89	64	67	85	83	86	61	75	59	69	84	75
3º	58	49	55	51	50	42	54	59	52	60	54	51	47	54	51
Média	60,3			56,7			64,4			55,5			59,6		
Média Total	59,3														
Campos	M21F1			M21F2			M21F3			M21F4			M21F5		
1º	63	55	55	66	60	73	50	62	52	68	61	49	59	60	56
2º	81	79	77	72	76	85	69	67	62	68	71	68	75	73	71
3º	74	77	62	57	71	73	44	36	44	60	67	52	66	54	59
Média	69,2			70,3			54,0			62,6			63,6		
Média Total	63,94														
<b>Grupo 3 Gy</b>															
Campos	M22F1			M22F2			M22F3			M22F4			M22F5		
1º	0	0	0	0	0	0	55	45	45	0	0	0	0	0	0
2º	17	19	14	10	12	12	58	50	69	18	22	24	12	14	11
3º	0	0	0	0	0	0	58	40	60	0	0	0	0	0	0
Média	5,5			3,7			53,3			7,1			4,1		
Média Total	14,74														
Campos	M23F1			M23F2			M23F3			M23F4			M23F5		
1º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2º	41	42	38	18	18	21	20	18	19	10	10	13	14	18	17
3º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	13,4			6,3			6,3			3,6			5,4		
Média Total	7,0														
Campos	M24F1			M24F2			M24F3			M24F5			M24F7		
1º	67	55	58	0	0	0	50	52	48	40	45	41	56	52	49
2º	70	70	66	45	43	42	61	58	54	48	49	60	73	65	66
3º	55	56	54	0	0	0	52	38	49	49	50	58	47	45	39
Média	61,1			14,4			51,3			48,8			54,6		
Média Total	46,04														

## Anexo E

Tabela 5 – Análise histomorfométrica - 18º dia pré-natal - Grupos Controle e 3 Gy

<b>Grupo Controle</b>															
Campos	M28F1			M28F2			M28F3			M28F4			M28F5		
1º	47	38	42	36	33	35	52	49	42	50	44	46	46	46	46
2º	55	67	77	66	72	60	66	61	72	63	60	53	64	54	60
3º	40	50	48	50	47	40	49	49	60	51	45	46	47	43	52
Média	51,5			48,7			55,8			50,8			50,8		
Média Total	51,52														
Campos	M29F1			M29F2			M29F3			M29F5			M29F6		
1º	43	36	49	42	42	37	52	52	47	46	49	47	43	42	50
2º	82	69	88	78	71	70	60	60	54	57	61	65	75	71	78
3º	52	48	45	50	54	53	41	42	42	40	45	44	45	46	44
Média	56,8			55,2			51,1			50,4			54,8		
Média Total	53,66														
Campos	M30F1			M30F2			M30F4			M30F5			M30F6		
1º	41	34	41	41	36	36	39	41	40	34	39	37	44	40	36
2º	61	72	72	75	72	65	75	83	75	63	65	65	85	88	83
3º	55	39	39	59	52	55	40	38	39	41	37	32	32	40	37
Média	50,4			54,5			52,2			45,8			53,8		
Média Total	51,34														
<b>Grupo 3 Gy</b>															
Campos	M31F1			M31F2			M31F3			M31F4			M31F5		
1º	28	30	38	45	49	45	47	54	54	47	37	36	42	48	50
2º	63	51	75	65	70	62	70	62	70	73	71	65	58	62	58
3º	43	42	46	47	41	47	43	40	39	36	39	40	34	39	35
Média	46,4			52,3			53,2			49,3			47,3		
Média Total	49,7														
Campos	M32F1			M32F2			M32F3			M32F4					
1º	43	47	48	45	42	42	43	47	43	0	0	0			
2º	53	55	56	48	48	49	51	50	62	14	23	23			
3º	43	50	40	43	41	38	43	49	40	0	0	0			
Média	48,3			44,0			47,5			6,6			0		
Média Total	36,6														
Campos	M33F1			M33F3			M33F4			M33F5			M33F9		
1º	23	31	32	38	39	38	38	45	42	46	41	40	44	49	41
2º	49	52	52	59	60	66	65	64	62	51	46	49	59	53	56
3º	36	36	36	43	43	38	40	39	34	43	37	39	49	48	47
Média	38,5			47,1			47,6			43,5			49,5		
Média Total	45,24														

## Anexo F

### Mann-Whitney Test and CI: C14, E14

N Median  
C14 15 59.20  
E14 15 18.10  
Point estimate for ETA1-ETA2 is 40.60  
95.4 Percent CI for ETA1-ETA2 is (30.10,45.90)  
W = 342.0  
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0.0000  
The test is significant at **0.00001** (adjusted for ties)

### Mann-Whitney Test and CI: C16, E16

N Median  
C16 15 60.30  
E16 15 7.10  
Point estimate for ETA1-ETA2 is 50.10  
95.4 Percent CI for ETA1-ETA2 is (15.70,55.59)  
W = 335.0  
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0.0000  
The test is significant at **0.00001 < 0.05** (adjusted for ties)

### Mann-Whitney Test and CI: C18, E18

N Median  
C18 15 51.50  
E18 14 47.40  
Point estimate for ETA1-ETA2 is 5.05  
95.3 Percent CI for ETA1-ETA2 is (2.60,7.90)  
W = 302.0  
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0.0008  
The test is significant at **0.0008** (adjusted for ties)

## Anexo G

### Test and CI for Two Proportions

Sample X N Sample p

1 48 48 1.000000

2 47 49 0.959184

Difference =  $p(1) - p(2)$

Estimate for difference: 0.0408163

95% CI for difference: (-0.0145847, 0.0962174)

Test for difference = 0 (vs not = 0):  $Z = 1.44$  P-Value = 0.149

Fisher's exact test: P-Value = 0.495

### Test and CI for Two Proportions

Sample X N Sample p

1 28 31 0.903226

2 28 37 0.756757

Difference =  $p(1) - p(2)$

Estimate for difference: 0.146469

95% CI for difference: (-0.0265711, 0.319509)

Test for difference = 0 (vs not = 0):

$Z = 1.66$  P-Value = 0.097 > 0.05

Fisher's exact test: P-Value = 0.200

### Test and CI for Two Proportions

Sample X N Sample p

1 40 40 1.000000

2 31 42 0.738095

Difference =  $p(1) - p(2)$

Estimate for difference: 0.261905

95% CI for difference: (0.128935, 0.394874)

Test for difference = 0 (vs not = 0):

$Z = 3.86$  P-Value = 0.0001 < 0.05

Fisher's exact test: P-Value = 0.0001

Peixoto BC. Biological effects of the radiotherapy in the expression of the epidermal growth factor (EGF) during odontogenesis in mice (*Mus musculus*) [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

## ABSTRACT

*Malignant neoplasm orofacial patients when receiving radiation therapy can present several types of radiation injuries and clinical manifestations, such as decrease of the salivary epidermal growth factor (EGF) levels. EGF is a small protein (53 amino acids) that stimulates the proliferation of cells of the mammals, being found in several organs in development. EGF can exercise a physiological role in the dental eruption through the interaction with other molecules such as transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), interleukin-1 (IL-1) and colony-stimulating factor-1 (CSF-1), which increases the bone reabsorption and stimulating the chemotaxis for mononuclear cells. The objective of this work was to verify through technique of immunohistochemistry, changes in the expression of the EGF in the odontogenesis of the first upper molar in *Mus musculus* mice embryos to the 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> days of intrauterine life. Pregnant mice was irradiated on the 10<sup>th</sup> gestacional day with a 3 Gray (Gy) dose. The microscopical mophological and histomorphometrical analysis showed a significant decrease in the number of EGF-positive dental epithelium cells in the 3 Gy group when compared with control group in 14<sup>th</sup> ( $P < 0,0001$ ), 16<sup>th</sup> ( $P < 0,0001 < 0,05$ ) and 18<sup>th</sup> ( $P < 0,0008$ ) intrauterine day periods. Supported by FAPESP n<sup>o</sup> 2008/54534-8.*

Keywords: Radiobiology. Radiotherapy. Ionizing Radiation. Odontogenesis. Intercellular Signaling Peptides and Proteins. EGF. Immunohistochemistry.