



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

GUSTAVO GUIMARÃES GUERRERO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DE PERIODONTITE APICAL EM
RATOS SUBMETIDOS A RADIOTERAPIA DE CABEÇA E
PESCOÇO**

2022

GUSTAVO GUIMARÃES GUERRERO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DE PERIODONTITE APICAL EM RATOS
SUBMETIDOS A RADIOTERAPIA DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos clínicos e laboratoriais de materiais e técnicas endodônticas.

Orientadora: Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Guerrero, Gustavo Guimarães

Influência de diferentes doses de radiação no desenvolvimento de periodontite apical em ratos submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço / Gustavo Guimarães Guerrero. - São José dos Campos : [s.n.], 2022. 67 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.
Orientadora: Marcia Carneiro Valera.

1. Periodontite Periapical. 2. Radiação Ionizante. 3. Radioterapia. 4. Rato. I. Valera, Marcia Carneiro, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Carneiro Valera (orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Cláudia Auxiliadora Pinto

Universidade de Taubaté (Unitau)

Campus de Taubaté

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcelos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 18 de Fevereiro de 2022.

DEDICATÓRIA

A conquista desse título tem muito significado na minha vida, pois é algo que sempre almejei e me dediquei para que esse momento chegasse. Sendo assim, tenho a honra de dedicar esse trabalho a essas pessoas que nunca me deixaram desistir.

À minha mãe, **Eliane**, que sempre se mostrou forte e resiliente, me fazendo acreditar que não importa qual seja meu sonho, ele será alcançado com muita dedicação e com seu apoio incondicional.

Ao meu pai e minha “boadrasta”, **Fernando e Lorena**, que juntos incentivam e apoiam minhas decisões profissionais sempre mostrando mais possibilidades que meus olhos conseguem enxergar.

Aos meus irmãos, **Rodrigo e Jade**, que vibram junto comigo a cada conquista realizada mesmo que façam questão de lembrar que não fiz mais que minha obrigação.

À minha irmã, **Paloma**, que me iniciou na odontologia e fez com que eu descobrisse minha verdadeira vocação, não consigo me imaginar em outra profissão e isso com certeza se deve a ela.

Em especial ao meu namorado, **Pedro**, que nesse tempo de pós graduação aguentou todos os meus temperamentos, sempre me lembrando do meu objetivo e me incentivando a continuar não importando o quanto podia parecer difícil. A frase “vai dar tudo certo” agora tem um verdadeiro significado. Deu tudo certo!

Acredito que ninguém pode voar tão alto sem que antes tenha tido um suporte e uma base que estará sempre ali caso necessite voltar, sendo assim, agradeço imensamente cada uma dessas pessoas por fazerem parte do meu suporte e da minha base. Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família de modo geral, que sempre fica feliz com minhas decisões e me incentivam a continuar trilhando o caminho que quero seguir.

Agradeço a todos meus amigos pessoais por me apoiarem nas minhas decisões profissionais, meus amigos são como uma família e sei que posso contar com o apoio de cada um deles.

Agradeço a minha orientadora, **Marcia Valera**, pela confiança ao me escolher como orientado, pela paciência ao me ensinar e por me mostrar que em meio a tantas adversidades que uma pandemia pode trazer ainda sim devemos continuar tentando e acreditando.

À toda minha equipe de pesquisa, **Giovanna Minhoto, Bruna Jordão, Rayana Khoury, Fernando César, Carolina Gagliardi e Itza Amarissis**, que individualmente se dedicaram a me ajudar mesmo que em horários alternativos e fins de semana.

Agradeço especialmente a doutoranda, **Giovanna Minhoto**, que foi mais do que parceira de equipe, foi minha orientadora, psicóloga e amiga quando eu mais precisei. Sem seu apoio e ensinamentos esse projeto não teria sido possível.

Aos meus amigos de pós graduação, em especial **Caroline Trefiglio e Fernando César**, que iniciaram junto comigo o curso e juntos passamos por cada desafio e evoluímos como profissionais.

Ao professor **Claudio Federico**, pela parceria e ensinamentos na área de radioterapia.

Ao **Instituto de Estudos Avançados** de São José dos Campos - IEAV pela parceria na radioterapia dos animais

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- **Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**- UNESP.

À **Capes** pela concessão de bolsa de mestrado e ao auxílio pesquisa

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**- FAPESP que concedeu bolsa de iniciação científica à minha aluna (Processo Nº 2020/13269-1)

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram para a execução desse trabalho

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Cálculo amostral.....	20
4.3 Distribuição das amostras	20
4.4 Protocolo RT	21
4.5 Protocolo de indução da lesão periapical	22
4.6 Grupo controle.....	23
4.7 Uso de analgesia.....	23
4.8 Análise comportamental	24
4.9 Eutanásia	25
4.10 Análise radiográfica	26
4.11 Análise por microtomografia computadorizada	26
4.12 Análise histológica	28
4.13 Análise estatística	30
5 RESULTADO	31
5.1 Porcentagem do ganho de peso	31
5.2 Teste de campo aberto (open field).....	32
5.3 Teste do labirinto (y maze)	35
5.4 Análise radiográfica	38

5.5 Análise microtomográfica.....	40
5.6 Análise histológica	43
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO.....	67

Guerrero GG. Influência de diferentes doses de radiação no desenvolvimento de periodontite apical em ratos submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço. Dissertação. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

A periodontite apical (PA) é uma patologia comum, entretanto, poucos estudos foram realizados sobre a mesma após a radioterapia (RT). Portanto, o presente estudo avaliou a influência de diferentes doses de radiação no desenvolvimento de periodontite apical em ratos submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço. Para essa avaliação, 54 ratos machos Wistar foram alocados em 6 grupos (n=9) de acordo com a dose de irradiação: RT-7,5 (dose única de 7,5 Gy); RT-10 (dose única de 10 Gy); RT-15 (dose única de 15 Gy); RT-30 (dose única de 30 Gy); Controle-PA (sem RT e indução de PA); Controle (sem RT e sem PA). Os animais foram irradiados na região da face direita e após 7 dias da realização da RT foi induzido a lesão periapical. Para indução de PA, as cavidades pulpares dos primeiros molares foram expostas ao meio bucal por 21 dias. As amostras da região apical dos primeiros molares foram submetidas a análises: a) análise comportamental por meio do campo aberto e labirinto; b) radiográfica e por microtomografia computadorizada, para medir a área e o volume da PA; c) histológica, para medir o grau de inflamação periapical; d) histomorfométrica para avaliar o nível de reabsorção óssea periapical. Os dados foram avaliados por testes estatísticos descritivos e inferenciais, conforme dados obtidos, segundo sua normalidade, em testes paramétricos e não paramétricos. Verificou-se que a dose de 30 Gy foi letal quando aplicada na região de cabeça e pescoço. Os animais tiveram menor ganho de peso quando submetidos a RT mas não houve diferença estatística em nenhum momento avaliado. Nas análises de campo aberto e labirinto verificou-se menor mobilidade dos animais dos grupos RT tanto no dia 7 como no final do experimento quando comparados aos controles ($p < 0,05$). Na análise microtomográfica verificou-se que a PA foi maior nos grupos irradiados sendo que o grupo RT-15 apresentou a maior PA quando comparado aos demais ($p < 0,05$). Conclui-se que a RT é um tratamento que induz um processo de estresse e depressão nos animais; quanto maior a dose utilizada, maior a PA desenvolvida nesses animais. A dose de 30Gy é letal quando utilizada na região de cabeça e pescoço e a dose de 15Gy mostrou maior volume de lesão periapical sendo a melhor dosagem a ser utilizada para estudos na Endodontia.

Palavras-chave: periodontite periapical. radiação ionizante. radioterapia. rato.

Guerrero GG. Influence of different radiation doses on the development of apical periodontitis in rats submitted to head and neck radiotherapy. Dissertation. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

Apical periodontitis (AP) is a common pathology, although few studies have been conducted on this one after radiotherapy (RT). Therefore, this project evaluates the influence of different radiation doses on the development of apical periodontitis in rats. For this evaluation, 54 male Wistar rats were allocated into 6 groups ($n = 9$) according to the irradiation dose: RT-7.5 (single dose of 7.5 Gy); RT-10 (10 Gy single dose); RT-15 (15 Gy single dose); RT-30 (30 Gy single dose); PA-Control (without RT and PA induction); Control (without RT and without PA). The animals were irradiated in the region of the right face and after 7 days of RT, a periapical lesion was induced. For PA induction, the pulp cavities of the first molars were exposed to the oral environment for 21 days. As the ones in the apical region of the first molars were submitted to analyses: a) behavioral analysis through the open field and Y-maze b) radiographic and computerized microtomography, to measure the area and the volume of the PA; c) histological, to measure the degree of periapical inflammation; d) histomorphometric to assess the level of periapical bone resorption. Data was obtained by descriptive and inferential statistical tests, according to data obtained, according to its normality, in parametric and non-parametric tests. It was found that the dose of 30 Gy was lethal when applied to the head and neck region. The animals had less weight gain when subjected to RT but there was no statistical difference at any time evaluated. In the open field and Y-maze analyses, lower mobility of animals in the RT groups was found both on day 7 and at the end of the experiment when compared to controls ($p < 0.05$). The microtomographic analysis showed that the PA was higher in the irradiated groups, and the RT-15 group had the highest PA when compared to the others ($p < 0.05$). It is concluded that RT is a treatment that induces a process of stress and depression in animals; the higher the dose used, the higher the BP developed in these animals. The 30Gy dose is lethal when used in the head and neck region and the 15Gy dose showed a greater volume of periapical lesion, being the best dose to be used for studies in Endodontics.

Keyword: periapical periodontitis. ionizing radiation. radiotherapy. rat.

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço vem aumentando consideravelmente; os dados de projeção para cada ano do triênio 2020-2022 mostram que aproximadamente 48 mil novos casos seriam diagnosticados somente no Brasil (INCA, 2019). Sendo assim, cada vez mais pessoas precisam se submeter a tratamentos debilitantes como a radioterapia (RT) por ser um tratamento de grande sucesso principalmente para tumores dessa região: cavidade oral, laringe, esôfago e tireoide, sendo o primeiro mais incidente entre os homens brasileiros (INCA, 2019). A RT local é uma opção de tratamento frequente, pois sua efetividade é alta independentemente do estágio de desenvolvimento do tumor (Argiris et al., 2008; Ministério da Saúde, 2015).

Embora necessária para remissão das células cancerígenas, a RT produz efeitos colaterais no tecido ósseo que modificam a sua estrutura de forma, muitas vezes, irreversível. O tempo entre a primeira sessão de RT e o início das alterações, bem como a severidade dessas, é dose-dependente. Inicialmente, a RT produz um rompimento no suprimento vascular ósseo, aumentando a permeabilidade vascular, com consequente aumento no edema perivascular, hemorragia de pequenos vasos e oclusão vascular. (Pitkänen, Hopewell, 1983).

A osteoclastogênese no osso irradiado ocorre de forma alterada. O aumento das citocinas pró-inflamatórias no tecido ósseo submetido à RT contribui para uma maior diferenciação das células osteoclásticas e diminuição na expressão de osteoblastos (Da Cruz Vegian et al., 2019; Godoi, 2018). Com isso, a formação de uma nova matriz óssea é prejudicada, com consequente reposição da medula óssea vermelha pela medula óssea amarela, a qual possui pobre vascularização (Ollivier et al., 2002).

Além disso, a cárie de radiação tem evolução rápida, expondo o sistema

de canais radiculares ao meio bucal em alguns meses (Hommez et al., 2012). A evolução desse processo leva ao desenvolvimento de alterações pulpares cuja progressão gera necrose desse tecido e consequentemente inflamação perirradicular com formação de lesão periapical (Takehashi et al., 1965).

A invasão microbiana no sistema de canais radiculares, diante da morte do tecido pulpar, provoca uma reação imunológica no hospedeiro, a qual serve como mecanismo de defesa e ao mesmo tempo promove a destruição dos tecidos perirradiculares (Márton, Kiss, 2000).

Os microrganismos provenientes do canal induzem às células do ligamento periodontal a regularem positivamente mediadores inflamatórios, os quais atraem as células inflamatórias para o sítio atingido, iniciando o processo reabsortivo (Jönsson et al., 2011; Lukić et al., 2006; Ohshima et al., 2008; Takeichi et al., 2008).

Assim como nos demais sítios do organismo, a via RANK-RANKL é também responsável pela reabsorção óssea nos tecidos periapicais (Márton et al., 2014), RANKL é expressa por osteoblastos, no entanto estudos têm mostrado que outras células também têm a capacidade de expressá-lo em lesões periapicais, como monócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, polimorfonucleares e linfócitos T ativados, o que contribui grandemente para o desequilíbrio entre o processo de remodelação e reabsorção óssea (Menezes et al., 2006; Vernal et al., 2006; Zhang et al., 2010). Adicionalmente, os subprodutos gerados pelas bactérias envolvidas no processo de necrose pulpar regulam positivamente a expressão de citocinas osteolíticas ou agem diretamente nas células do ligamento periodontal, induzindo a expressão de RANKL e OPG (Belibasakis et al., 2011; Kajiya et al., 2010; Wada et al., 2004). No entanto, esses mecanismos podem estar alterados após RT.

Indivíduos que são submetidos ao tratamento com RT sofrem alterações comportamentais e nas estruturas de cabeça e pescoço e demandam um

atendimento odontológico diferenciado em relação aos pacientes que não passam por esse tratamento. Devido essa debilidade pós RT se faz necessário que os estudos sejam conduzidos em animais afim de evitar o atendimento destes pacientes sem antes ter-se protocolos que possam contribuir de forma significativa para o sucesso do tratamento nestes pacientes e consequentemente melhorar da qualidade de vida dos mesmos.

Diferentes doses de radiação são utilizadas nos poucos estudos que envolvem radiação de cabeça e pescoço em animais. Portanto, observa-se que não há um protocolo bem determinado da dose de radiação para estudos em animais bem como nenhum estudo avaliou essas doses no desenvolvimento de PA. Assim, é necessário um avaliar o efeito dessas doses no organismo animal, bem como sua associação com a periodontite apical (Nagler et al., 2001; Cihan et al., 2013; Elsaadany et al., 2020; Hsieh et al., 2013).

Pensando nisso, esse estudo propôs utilização de ratos como modelo animal para avaliar a influência de diferentes doses de radiação no desenvolvimento da lesão apical em animais submetidos a RT de cabeça e pescoço. Além disso foram avaliados os mecanismos pelos quais a RT exerce seus efeitos na PA por meio de análises histológica, radiográfica e microtomográfico, além de avaliar as alterações comportamentais desses animais. Dessa forma, esse estudo servirá como a definição do melhor protocolo de RT equivalente em ratos para que possam ser realizados novos estudos nessa mesma linha de pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer de cabeça e pescoço se refere aos tumores que acometem as regiões da cavidade oral, laringe, esôfago e tireoide. Este, compreendeu 5% de todos os tipos de câncer incidentes em 2017, com uma mortalidade média de 60%; em geral, a taxa de mortalidade considerando todos os tipos de cânceres foi de 39% (Fitzmaurice et al., 2019).

No Brasil, estimativas apontam que para o triênio 2020-2022, 48 mil novos casos serão detectados na população brasileira (INCA, 2019). A cavidade oral, de especial interesse para o cirurgião-dentista, figura como o principal sítio acometido (INCA, 2019).

A etiologia das neoplasias de cabeça e pescoço é, em geral, multifatorial, mas os principais fatores de risco são o consumo de álcool e tabaco; outros fatores associados são sexo masculino, aumento da idade e pobre estado nutricional (American Cancer Society, 2018). Mais recentemente, a infecção pelo HPV tem sido apontada como outro possível fator de risco para o desenvolvimento de carcinomas orofaríngeos (Agalliu et al., 2016).

Com altas taxas de mortalidade (Fitzmaurice et al., 2019), alguns fatores podem aumentar a chance de sobrevida do indivíduo diagnosticado com esse tipo de neoplasma. Pacientes mais jovens, com diagnóstico da doença em estágios menos avançados, que abandonaram o uso do cigarro e que foram tratados com abordagens terapêuticas curativas tiveram uma chance maior de sobreviver a longo prazo do que indivíduos mais velhos, com diagnóstico tardio da doença, que continuaram com o hábito de fumar e que foram submetidos à abordagens mais paliativas de tratamento da doença (Loganadane et al., 2019; Smith et al., 2019; Talani et al., 2019).

A RT é uma opção de tratamento para neoplasias de cabeça e pescoço, a

qual pode ser utilizada isoladamente ou em combinação com quimioterapia e/ou ressecção cirúrgica do tumor (Gregoire et al., 2010). A grande vantagem da aplicação da RT está na possibilidade de preservação da função, uma vez que com o tratamento cirúrgico isolado, tecidos adjacentes saudáveis são inevitavelmente removidos. No entanto, a impossibilidade de isolamento da massa tumoral durante a aplicação da RT, faz com que a toxicidade produzida pela radiação afete não só as células tumorais, como também os tecidos saudáveis, acarretando em efeitos deletérios indesejáveis (Khan, 2003).

Nas últimas décadas, novas tecnologias de planejamento da RT, conhecidas como radioterapia conformacional tridimensional (convencional 3D), têm aumentado a eficácia do tratamento e diminuído os efeitos nos tecidos circunvizinhos por entregarem a dose de radiação mais diretamente na massa tumoral (Khan, 2003). Mais recentemente, o emprego da metodologia de planejamento de radioterapia de intensidade modulada (IMRT) tem trazido a esperança de uma menor toxicidade aos tecidos adjacentes, por conseguir controlar de forma ainda maior a dose de radiação de acordo com o volume da massa tumoral (Puri et. al., 2005; Zhong et. al., 2021). No entanto, evidências clínicas que suportem a diminuição dos efeitos colaterais traduzidos em aumento na qualidade de vida dos indivíduos tratados com a técnica parecem não ser suficientemente fortes para justificar a substituição da metodologia convencional 3D pela IMRT, principalmente no âmbito da saúde pública em países com escassez de recursos como o Brasil (Ministério da Saúde, 2017), por tratar-se de tecnologias mais onerosas.

Na vida adulta, o esqueleto sofre continuamente um processo simultâneo de reabsorção e remodelamento ósseo, os quais são regidos pelo trabalho em conjunto entre células, hormônios, proteínas e citocinas. As células responsáveis pela síntese e degradação da matriz óssea são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Maeda, Silva, 2014).

Diante de estímulos específicos provenientes de citocinas pró-inflamatórias e de hormônios, células mononucleares provenientes de células-tronco hematopoiéticas se diferenciam em pré-osteoclastos que se fundem para formar o osteoclasto maduro. Esta diferenciação da célula precursora em uma célula madura ativa, capaz de se ligar ao sítio ósseo e dissolver a sua parte orgânica e inorgânica, só é possível através da síntese, pelos osteoblastos e osteócitos, de uma proteína chamada RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta). Uma vez produzida, ela se liga ao seu receptor (RANK), que é expresso nos precursores dos osteoclastos, induzindo a maturação dessas células. Uma vez maduro, o osteoclasto está pronto para assumir seu papel de reabsorver o tecido ósseo (Boyce et al., 2008).

A função do osteoblasto no metabolismo ósseo se dá, primeiramente, através da síntese de uma matriz orgânica (osteóide) composta predominantemente por colágeno tipo I (Nakahama, 2010; Titorencu et al., 2014). O osteoblasto também contribui para processo de reabsorção ao sintetizar o RANKL. Porém, ele prejudica este processo ao liberar uma molécula que se conecta ao RANKL, impedindo sua ligação ao receptor RANK, a osteoprotegerina (OPG). A síntese de OPG se dá através de estímulos vindos de outras citocinas e hormônios, como o TGF- β (fator de transformação do crescimento beta) e estrógenos (Boyce, 2013; Boyce et al., 2008; Kearns et al., 2008; Silva, Branco, 2011).

A terceira importante célula que contribui para o metabolismo ósseo é o osteócito. Ele é derivado do osteoblasto, encontra-se imerso na massa óssea e representa entre 90% e 95% das células do tecido ósseo. Atualmente, estudos têm sugerido sua intensa contribuição para a manutenção da homeostase óssea, contrapondo a teoria de que essas são células sem qualquer atividade (Bonewald, 2011; Dallas et al., 2013; Franz-Odenaal et al., 2006).

A invasão microbiana no sistema de canais radiculares, diante da morte

do tecido pulpar, provoca uma reação imunológica no hospedeiro, a qual serve como mecanismo de defesa e ao mesmo tempo promove a destruição dos tecidos perirradiculares (Márton, Kiss, 2000).

Os microrganismos provenientes do canal induzem às células do ligamento periodontal a regularem positivamente mediadores inflamatórios, os quais atraem as células inflamatórias para o sítio atingido, iniciando o processo reabsortivo (Jönsson et al., 2011; Lukić et al., 2006; Ohshima et al., 2008; Takeichi et al., 2008).

Assim como nos demais sítios do organismo, a via RANK-RANKL é também responsável pela reabsorção óssea nos tecidos periapicais (Márton et al., 2014). Além da expressão do RANKL pelos osteoblastos, estudos têm mostrado que outras células também têm a capacidade de expressá-lo em lesões periapicais, como monócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, polimorfonucleares e linfócitos T ativados, o que contribui grandemente para o desequilíbrio entre o processo de remodelação e reabsorção óssea (Menezes et al., 2006; Vernal et al., 2006; Zhang et al., 2010). Adicionalmente, os subprodutos gerados pelas bactérias envolvidas no processo de necrose pulpar regulam positivamente a expressão de citocinas osteolíticas ou agem diretamente nas células do ligamento periodontal, induzindo a expressão de RANKL e OPG (Belibasakis et al., 2011; Kajiya et al., 2010; Wada et al., 2004).

Entretanto, na maioria dos casos, a PA é autolimitante (Márton et al., 2014). Além disso, um equilíbrio entre as defesas do hospedeiro e os produtos gerados pelos patógenos podem também colaborar com um balanço entre o processo reabsortivo e o de formação óssea (Wang et al., 2011).

Embora necessária para remissão das células cancerígenas, a RT produz efeitos colaterais no tecido ósseo que modificam a sua estrutura de forma, muitas vezes, irreversível. O tempo entre a primeira sessão de RT e o início das alterações, bem como a severidade dessas, é dose-dependente. Inicialmente, a

RT produz um rompimento no suprimento vascular ósseo, aumentando a permeabilidade vascular, com consequente aumento no edema perivascular, hemorragia de pequenos vasos e oclusão vascular. O suprimento sanguíneo pode retornar ao normal com o passar do tempo (especialmente em protocolos com baixas doses de radiação), porém os efeitos no tecido ósseo são permanentes (Pitkänen, Hopewell, 1983).

A osteoclastogênese no osso irradiado ocorre de forma alterada. O aumento das citocinas pró-inflamatórias no tecido ósseo submetido à RT contribui para uma maior diferenciação das células osteoclásticas e diminuição na expressão de osteoblastos (Da Cruz Vegian et al., 2019; Godoi, 2018). Com isso, a formação de uma nova matriz óssea é prejudicada, com consequente reposição da medula óssea vermelha pela medula óssea amarela, a qual possui pobre vascularização (Ollivier et al., 2002).

A perda óssea periodontal pode ser acentuada em indivíduos pós-tratamento radioterápico na região dos maxilares (Marques, 2004), principalmente naqueles com doença periodontal pré-existente (Schoorhuis et al., 2018). Essa alteração parece ser mais relacionada à própria ação deletéria da radiação no osso do que pela mudança na microbiota da placa dentária, já que essa última tende a normalizar após um ano do término da RT (Al-Nawas, Grötz, 2006).

Na endodontia ainda não existem estudos que avaliam o quanto a irradiação interfere no desenvolvimento da lesão periapical, bem como na reparação tecidual. Além disso, trabalhos dessa natureza ainda não foram realizados em ratos Wistar. Assim, esse estudo foi preliminar para verificar o efeito da RT no desenvolvimento da PA estabelecendo um protocolo para estudos futuros.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in vivo* laboratorial com a utilização de ratos Wistar foi conduzido com objetivo de avaliar a influência de diferentes doses de radiação no comportamento animal e no desenvolvimento de periodontite apical induzida em ratos submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço. Para isso, foram avaliados:

- Alterações comportamentais e de peso causadas em animais submetidos as diferentes doses de radiação e indução da lesão periapical;
- A área da PA induzida em ratos submetidos à RT de cabeça e pescoço e comparar a controles que não receberão a RT, por meio de radiografia periapical;
- O volume da PA induzida em ratos submetidos à RT de cabeça e pescoço e comparar a controles que não receberão a RT, por meio de microtomografia computadorizada;
- A extensão e o grau de infiltrado inflamatório presente na PA induzida em ratos submetidos à RT de cabeça e pescoço e comparar a controles que não receberão a RT, por meio de histologia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa segue rigorosamente as diretrizes estabelecidas na Lei Federal no 11.794, de 9 de outubro de 2008, a qual determina as regras sobre o uso de animais em experimentos científicos.

4.1 Animais

O projeto foi encaminhado e aprovado sob protocolo 13/2020 pelo Comitê de Ética em Pesquisa na utilização de animais (CEUA) do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos/UNESP, instituição credenciada ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os animais utilizados no estudo foram ratos machos imunocompetentes da linhagem Wistar com 60 dias de idade e peso aproximado de 300 gramas, provenientes do Biotério Central da UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério do ICT São José dos Campos/UNESP, em microisoladores (4 animais/microisolador), equipados com filtros de entrada e saída de ar, temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 07h; luzes apagadas às 19h). Os ratos receberam ração moída e água filtrada ad libitum e aguardaram um período de 30 dias para adaptação ao novo ambiente.

Nenhum procedimento experimental foi realizado no espaço destinado à manutenção dos animais, a fim de evitar a produção de qualquer tipo de estresse comportamental. Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em 22 ± 1 °C e utilizado um período de adaptação ao

novo ambiente de pelo menos 1 h. Todos os experimentos foram realizados entre 8 e 18 h.

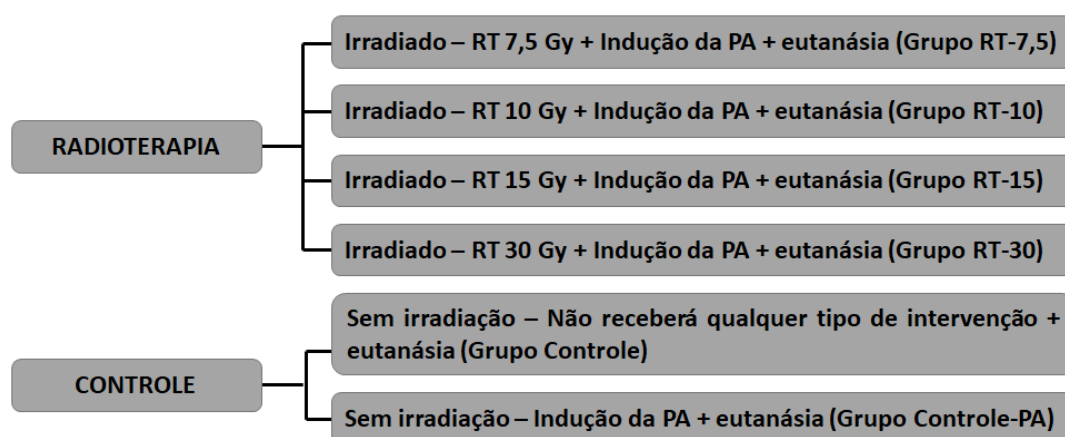
4.2 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi realizado através do programa Sealed Envelope (www.sealedenvelope.com) baseando-se nos dados de um estudo de Pinto et al., (2020). Considerando que a área de reabsorção óssea no grupo controle foi de 3,39 ($\pm 0,61$) e que o grupo experimental apresentou uma reabsorção óssea média de 5,40 ($\pm 1,27$), com um α estabelecido em 0,05 para determinar o nível de significância estatística e um poder de 80%, o número mínimo de 8 animais por grupo foi considerado necessário. Devido à possibilidade de perda de amostra durante o estudo, foi planejado um aumento de 10% no número de animais. Seguindo esse cálculo planejamos 54 animais no total que serão divididos em 6 grupos com $n=9$.

4.3 Distribuição das amostras

A distribuição dos animais foi conduzida de forma aleatória e em bloco, compreendendo seis grupos, cada um com um $n=9$. No total, foram envolvidos 54 animais para realização do estudo, submetidos aos protocolos de tratamento conforme o diagrama abaixo (Figura 1):

Figura 1 - Distribuição da amostra nos grupos

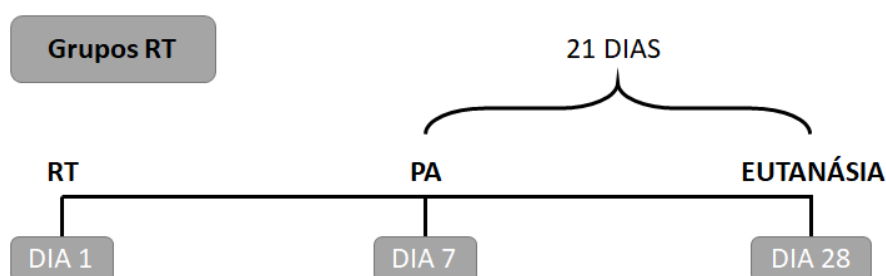


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Protocolo RT

Os animais dos grupos RT-7,5, RT-10, RT-15 e RT-30 foram anestesiados através da administração intraperitoneal de uma mistura de xilazina 2% (10 mg/kg Anasedan; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil) e ketamina 10% (100 mg/kg peso, Dopalen; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil) e foram irradiados na região da face direita com as doses de 7,5 Gy, 10 Gy, 15Gy e 30 Gy respectivamente. A irradiação foi realizada em dose única, no primeiro dia de experimento. Após 7 dias, foi induzido a lesão periapical (Figura 2). O aparelho utilizado para a aplicação da RT foi o modelo Eldorado 78 (Atomic Energy of Canadian Limited), o qual utiliza uma fonte de radiação gama proveniente de cobalto-60, localizado no Instituto de Estudos Avançados (IEAv) do Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA), em São José dos Campos, São Paulo. O transporte UNESP - IEAV seguiram rigorosamente a legislação e os procedimentos para o bem-estar dos animais, bem como a emissão da Guia de Transporte Animal (GTA).

Figura 2 – Eixo temporal do experimento nos grupos que receberão a RT



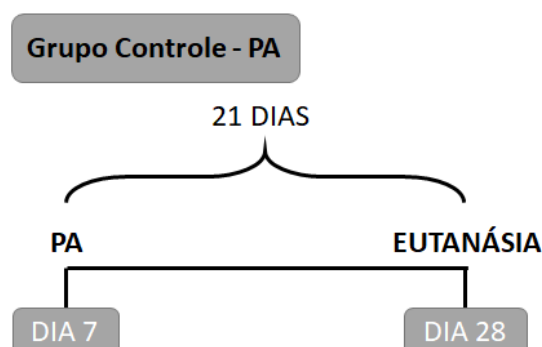
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Protocolo de indução da lesão periapical

Após sete dias do início do experimento, foram realizados os procedimentos necessários para o desenvolvimento das PA em todos os grupos envolvidos no estudo (Figuras 2 e 3). A metodologia seguiu baseada em trabalhos publicados na literatura (Khoury et. al., 2020).

Os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de uma mistura de xilazina 2% (10 mg/kg Anasedan; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil) e ketamina 10% (100 mg/kg peso, Dopalen; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil). A abertura coronária dos primeiros molares inferiores (lado direito) foi realizada com brocas carbide de alta rotação (1/4 mm de diâmetro) sob refrigeração constante. As câmaras pulpares foram deixadas expostas ao meio bucal para permitir o desenvolvimento da PA (Kakehashi et. al., 1965).

Figura 3 - Eixo temporal do experimento no grupo sem irradiação



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Grupo controle

Os animais do grupo Controle estiveram no mesmo ambiente em que os demais grupos, mas sem receber qualquer tipo de indução de lesão ou tratamento. Eles foram utilizados para comparação quanto ao desenvolvimento de uma possível alteração periapical devido ao estresse do confinamento (Khoury et al., 2020; Chen et al., 2019), e ficaram aguardando o momento da eutanásia após 28 dias do início do experimento.

4.7 Uso de analgesia

Considerando a invasividade dos procedimentos e grau de dor gerado, é adequado a utilização de opioides (animais submetidos apenas à periodontite apical – Tramal 7 mg/kg a cada 24 horas, via oral, de 3 a 5 dias; animais submetidos à indução de periodontite apical + tratamento radioterápico – Tramal

10 mg/kg a cada 24 horas, via oral, de 3 a 5 dias).

4.8 Análise comportamental

A análise foi realizada ao início do experimento, 7 dias após a radioterapia e no dia da eutanásia, conforme descrito abaixo:

Todos os animais foram levados para a sala de experimento 30 minutos antes dos testes comportamentais e seguiram o princípio de duplo-cego. Todos os animais passaram pelo teste comportamental de acordo com a seguinte ordem:

Peso corporal: Foi realizada pesagem dos animais previamente no primeiro dia do experimento, 7 dias após radioterapia e no momento da eutanásia (Figura 4).

Teste de campo aberto: Foi utilizado um dispositivo de acrílico de 80cm x 80 cm x 40 cm com o fundo da caixa dividido em quadrados equiláteros. Os ratos foram colocados no centro do campo aberto. Registramos o número de quadrados cruzados pelos animais, a movimentação do animal horizontalmente (quatro patas dentro de um quadrado). Os animais ficaram por 1 minuto para adaptação ao ambiente e após este período realizou-se a análise por 3 minutos (Song et al., 2018; Lotan et al., 2018) (Figura 4).

Labirinto em Y: Foi utilizado um dispositivo de acrílico em formato de Y com três braços com as seguintes medidas: 45 X 35 X 12cm. Os animais foram colocados um por vez na área de intersecção dos três braços, permitindo que o animal tomasse decisões sobre o trajeto percorrido. Este teste foi utilizado para analisar se a capacidade exploratória do animal estava alterada. O número de entradas do animal nos “braços” do Y foi contado sendo que uma entrada exige que ambas as patas traseiras atravessassem totalmente a linha divisória da

entrada do braço (Figura 4).

Figura 4 – Imagem ilustrativa dos dispositivos para testes comportamentais



A) Pesagem corporal; B) Teste de campo aberto (Open field); C) Teste do labirinto (Y-maze).
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.9 Eutanásia

Passados 28 dias desde o início do experimento para os todos os grupos (Figuras 2 e 3), os animais foram eutanasiados através da anestesia profunda com os mesmos anestésicos e em dose triplicada, de xilazina 2% (30 mg/kg Anasedan; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil) e ketamina 10% (300 mg/kg peso, Dopalen; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil), à utilizada do procedimento descrito anteriormente. Depois da eutanásia, as amostras pertinentes ao estudo foram coletadas e o lixo biológico foi destinado ao setor de descarte da UNESP São José dos Campos.

4.10 Análise radiográfica

Após a eutanásia, radiografias periapicais digitais foram obtidas de forma padronizada para determinar o diâmetro das lesões periapicais. Para isso, um sensor digital (Imagem Dental Master Fit, BR) foi utilizado e o aparelho de RX (Microimagem) foi posicionado perpendicularmente a uma distância de 30 cm do conjunto mandíbula/filme com tempo de exposição de 0,2 segundos.

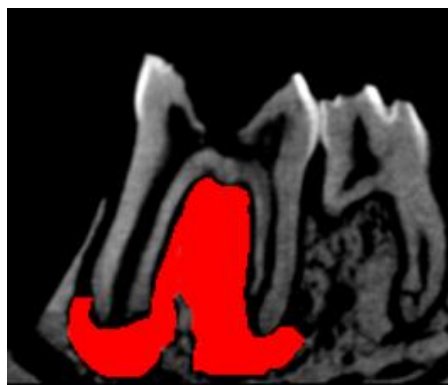
Com o auxílio do programa ImageJ, um endodontista cegado para os grupos experimentais realizou a análise das radiografias. O tamanho das lesões foi medido delimitando a área em mm².

4.11 Análise por microtomografia computadorizada

Para realização da análise microtomográfica foi utilizado um aparelho modelo 1176 da fabricante SkyScan® (SkyScan 1176 in vivo, Skyscan, Kontich, Belgium) e então, após a fixação, as hemimandíbulas de cada grupo experimental foi preparada para escaneamento microtomográfico. As peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostra apropriado para o equipamento, presas no meio de um isopor cilíndrico bipartido envoltas por papel absorvente úmido, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento e mantendo a umidade da peça. O escaneamento das amostras foi padronizado com um tamanho de voxel isotrópico de 18 µm, 50 kV, 500 µA, em 180°, ângulo de rotação de 0.0120 e filtro de Al 0,5 mm com tempo de exposição de 380 milissegundos ou seja 0,5s, utilizando um filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura. O programa

NRECON® v 1.6.3.3 em cerca de 395 fatias de acordo com os parâmetros anatômicos adotados foi utilizado para reconstrução das imagens. O programa DataViewer® foi utilizado para visualização e avaliação em 2D (medidas lineares) dos eixos sagital, coronal e axial. A linha verde representa o eixo Y, a linha azul o Eixo X, e a linha vermelha o eixo Z. As imagens foram posicionadas de forma que cada eixo ficasse paralelo a raiz mesial no plano sagital e coronal, e que de forma automática se ajusta ao centro da raiz mesial no plano axial. Para as análises volumétricas foi escolhido um eixo de interesse (sagital) e utilizado um programa específico de análise 3D (CTan®). O objetivo das análises volumétricas (3D) é quantificar o volume do osso alveolar na região do periápice, para tanto, foi escolhido como ponto central corte (slice) o local onde a lesão periapical apareceu em sua maior extensão. O ponto final da seleção foi determinado em 50 slices no sentido vestíbulo lingual e 50 slices no sentido linguo vestibular, totalizando uma região de interesse composta por 101 slices em todas as amostras. Essa região corresponde a área de interesse (ROI) onde foi quantificada a reabsorção óssea periapical (Figura 5). Utilizou-se o ROI personalizado afim de permitir um delineamento manual da lesão periapical fornecendo um tamanho mais preciso do volume da reabsorção óssea. Todos os cálculos foram realizados sobre a região de interesses selecionada. Selecionados os parâmetros de interesse, os resultados apareceram em uma tabela contendo cada parâmetro calculado pelo CTAnalyser e sua respectiva unidade de medida. O volume tecidual (TV), volume ósseo (BV) e proporção BV/TV foram quantificados. Todas as medidas foram realizadas por um examinador calibrado que não tinha nenhuma informação de identificação dos grupos avaliados.

Figura 5– Imagem tomográfica ilustrativa em corte sagital da região de interesse (ROI) em vermelho, delimitada manualmente de forma personalizada



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.12 Análise histológica

As hemi-mandíbulas direitas de cada grupo foram desmineralizadas em solução de EDTA (etilenodinitrilotetracético – TITRIPLEX III- Merck) por 5 meses. Após desmineralizadas, as peças foram lavadas abundantemente em água corrente e submetidas à técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. Foram realizados cortes semiseriados, de forma que o primeiro corte a ser considerado para análise fosse o primeiro que aparecer as duas raízes (mesial e distal). O corte foi feito paralelo as raízes e montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina.

Para análise da extensão da lesão periapical, os cortes foram fotografados com microscópio de Luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss do Brasil), com câmera digital acoplada Canom, modelo Power Shot A640. Foi obtida uma imagem digital (formato JPEG) em aumento de 4x (1 imagem) e 40x (10 imagens). Posteriormente, as lâminas foram avaliadas morfológicamente e quantitativamente quanto à presença da lesão periapical e extensão da lesão

periapical. As análises foram realizadas por um examinador calibrado utilizando o software ImageJ.

Os dados obtidos nas análises histológica e histomorfométrica foram anotados em tabelas para posteriormente serem analisados estatisticamente.

Para análise histomorfométrica foi verificado o infiltrado inflamatório, sua intensidade e extensão (Cintra et al., 2014). O número médio de células inflamatórias foi avaliado por área e extensão ao redor do forame apical.

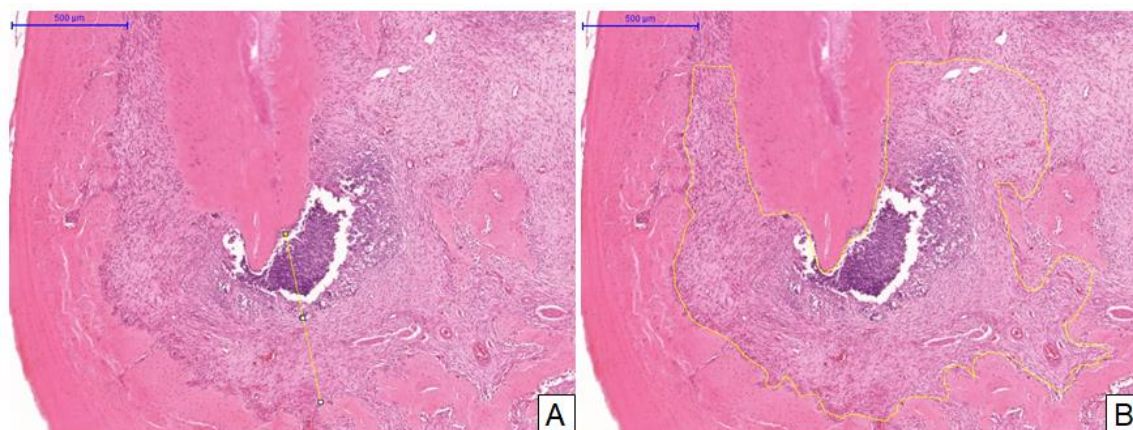
O número de células inflamatórias foi calculado por meio da média de 10 áreas separadas (ampliação x40) para cada grupo.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi classificada através de scores sendo: score 1 (0 a 25 células inflamatórias); score 2 (25 a 50 células inflamatórias); score 3 (50 a 75 células inflamatórias); score 4 (acima de 75 células inflamatórias).

A extensão do infiltrado inflamatório foi também classificada através de scores sendo: score 1 (0 a poucas células inflamatórias, sendo menor que 300 μm de comprimento), score 2 (células ocupando 300 μm de comprimento), score 3 (células ocupando até 600 μm de comprimento) e score 4 (células ocupando um comprimento > 600 μm) (Khoury et al., 2020).

A área de lesão periapical associada ao terço apical da raiz distal do primeiro molar mandibular foi medida pelo software Image J (Domínio Público). Foi realizado o delineamento manual do limite da lesão, considerando a superfície externa do cimento, o ligamento periodontal e a superfície externa do osso alveolar expresso em mm^2 .

Figura 6 – Imagem histológica referente a extensão e a área do infiltrado inflamatório



A) Mensuração da extensão do infiltrado inflamatório: linha iniciando do forame apical; B) delimitação manual da área da lesão de forma personalizada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.13 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para escolha dos testes estatísticos. Os seguintes testes estatísticos foram aplicados em situação de normalidade dos dados: ANOVA e Tukey para os dados paramétricos e Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Os valores foram apresentados como média e desvio padrão (dados contínuos) e frequência e porcentagem (dado ordinal). O programa estatístico utilizado foi o programa GraphPad Prism (versão 3.1, da GraphPad Software, USA), com o nível de significância estatística estabelecido em 5% ($P < 0,05$) para todos os dados avaliados.

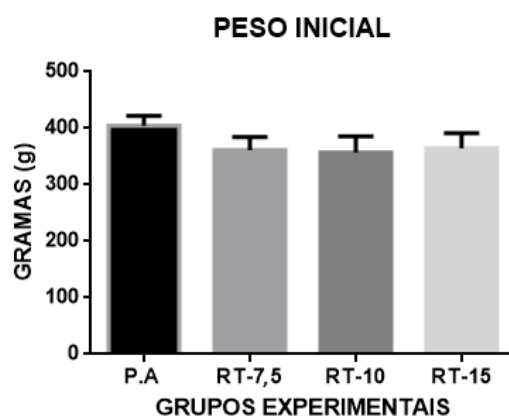
5 RESULTADO

Nenhum animal do grupo RT-30 sobreviveu após a RT, mostrando que essa dosagem foi letal para esses animais.

5.1 Porcentagem do ganho de peso

Verificou-se que no dia 1, o peso corporal dos animais de todos os grupos foi semelhante com valor médio: Controle-PA 404,2g $\pm$ 17,88; RT-7,5 361,7g $\pm$ 22,7; RT-10 357,2g $\pm$ 28,95 e RT-15 364,4g $\pm$ 26,92 e sem diferença entre os grupos ($p=0,6315$) ($p>0,05$) (Figura 7).

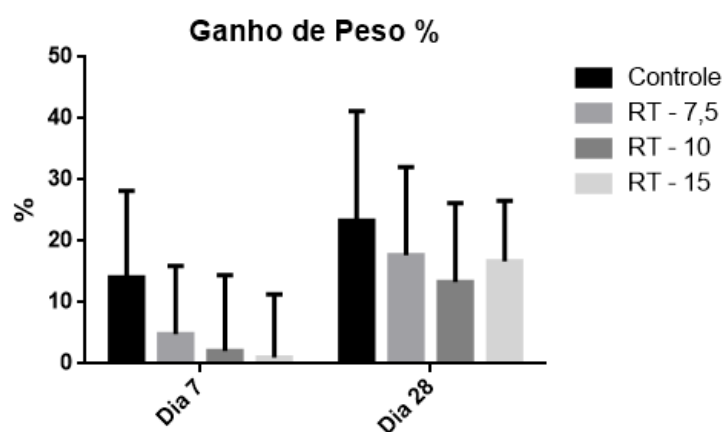
Figura 7 – Representação gráfica do peso corporal médio inicial nos grupos irradiados comparados com o Controle-PA (sem irradiação).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a RT todos os animais ganharam peso sendo que no dia 7, a porcentagem média de ganho foi inversamente proporcional a dose de radiação: Controle- PA $14,11\% \pm 14,11$; RT-7,5 $4,867\% \pm 11,12$; RT-10 $2,106\% \pm 12,37$ e RT-15 $1,005\% \pm 10,35$. Embora os grupos submetidos a RT tenham apresentado menor ganho de peso, não houve diferença entre eles e entre o controle ($p=0,6563$) ($p>0,05$). No dia 28 a porcentagem média de ganho de peso foi superior no grupo Controle-PA ($23,33\% \pm 17,87$) mas não houve diferença significantes em relação aos grupos RT que apresentaram porcentagem média de ganho de peso: RT-7,5 $17,68\% \pm 14,41$; RT-10 $13,32\% \pm 12,86$ e RT-15 $16,72\% \pm 9,9$ ($p=0,8985$) ($p>0,05$) (Figura 8).

Figura 8 – Representação gráfica da porcentagem do ganho de peso dos animais dos grupos irradiados comparados com os não irradiados.

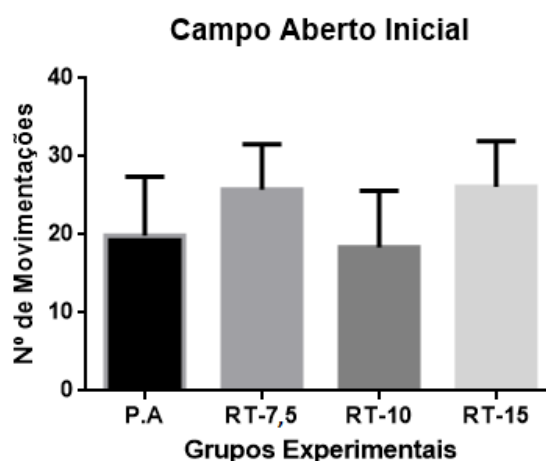


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Teste de campo aberto (open field)

Verificou-se que no início do experimento (dia 1), a movimentação média dos animais no “open field” foi semelhante: Controle- PA $19,88 \pm 7,549$; RT-7,5 $25,75 \pm 5,825$; RT-10 $18,38 \pm 7,249$ e RT-15 $26,13 \pm 5,817$. Assim, não foi encontrado diferença estatística na avaliação de campo aberto quando comparados os grupos irradiados com o grupo controle sem irradiação e com lesão PA no momento da avaliação inicial ($p=0,0545$) ($p>0,05$) (Figura 9).

Figura 9 – Representação gráfica da avaliação de campo aberto inicial dos grupos irradiados comparados com os não irradiados.

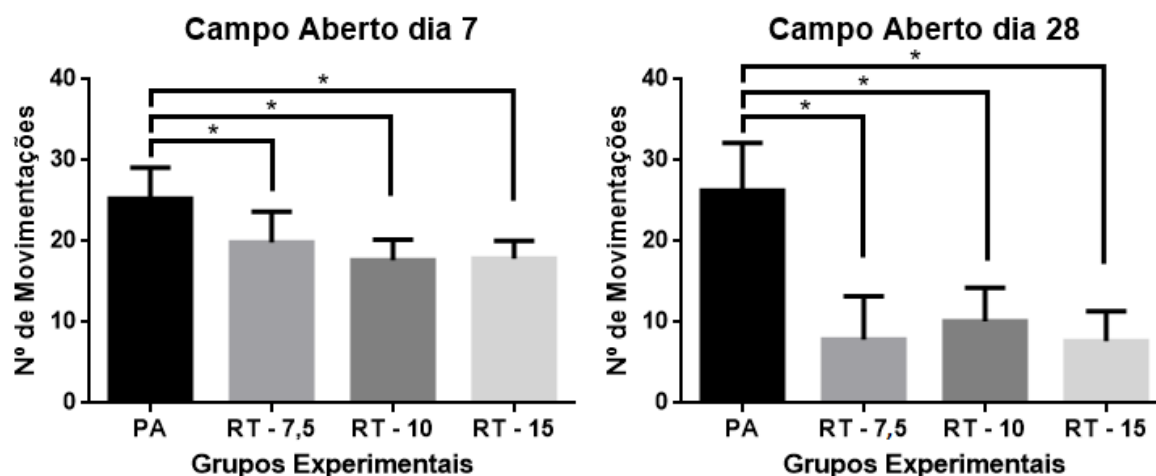


Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 7 dias do experimento verificou-se que os animais do grupo Controle-PA apresentaram em média $25,25 \pm 3,882$ movimentações diferindo estatisticamente na avaliação de campo aberto dos grupos irradiados: RT-7,5 $19,86 \pm 3,805$; RT-10 $17,67 \pm 2,55$ e RT-15 $17,89 \pm 2,205$ ($p<0,0001$) ($p>0,05$). No dia 28 do experimento os animais que receberam a RT se movimentaram menos RT-7,5 $7,833 \pm 5,382$; RT-10 $10,11 \pm 4,137$ e RT-15 $7,667 \pm 3,708$ e foram

significativamente diferentes do grupo Controle-PA $26,25 \pm 5,922$ ($p < 0,0001$) ($p > 0,05$) (Figura 10).

Figura 10 – Representação gráfica da avaliação de campo aberto

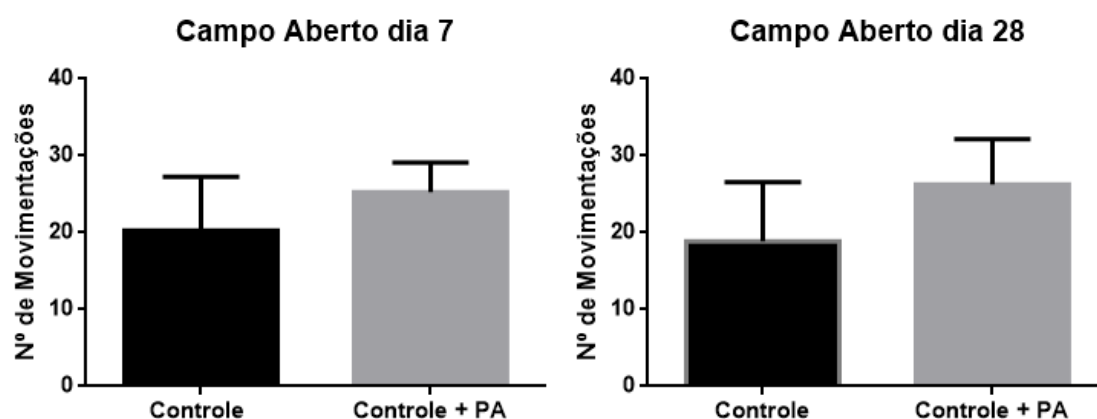


Verifica-se que no dia 7 e no final do experimento (dia 28) os grupos irradiados se movimentaram menos, quando comparados com o não irradiado onde o (*) representa diferença estatística.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao comparar os dois grupos controles, sem irradiação, não foi encontrado diferença estatística em relação a avaliação de campo aberto em nenhum momento avaliado (Figura 11).

Figura 11 – Representação gráfica da avaliação de campo aberto no dia 7 e final do experimento (dia 28) nos grupos controle (sem PA e sem RT) e Controle-PA.

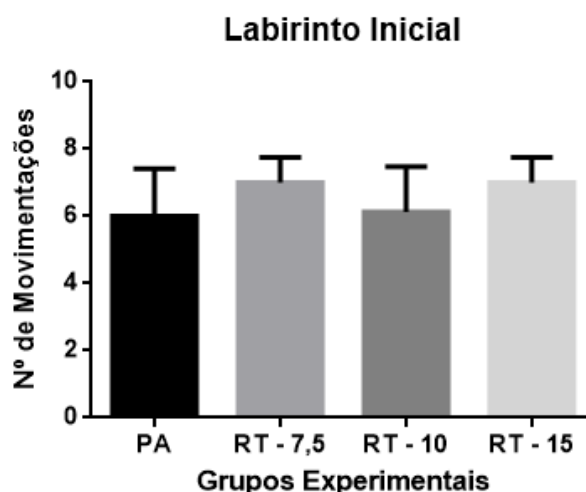


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Teste do labirinto (y maze)

No dia 1, início do experimento, verificou-se que todos os animais com RT apresentavam movimentação média semelhante no labirinto em Y (RT-7,5 $7 \pm 0,7559$; RT-10 $6125 \pm 1,356$ e RT-15 $7 \pm 0,7559$) e Controle-PA ($6 \pm 1,414$) ($p=0,1528$) ($p>0,05$) (Figura 12).

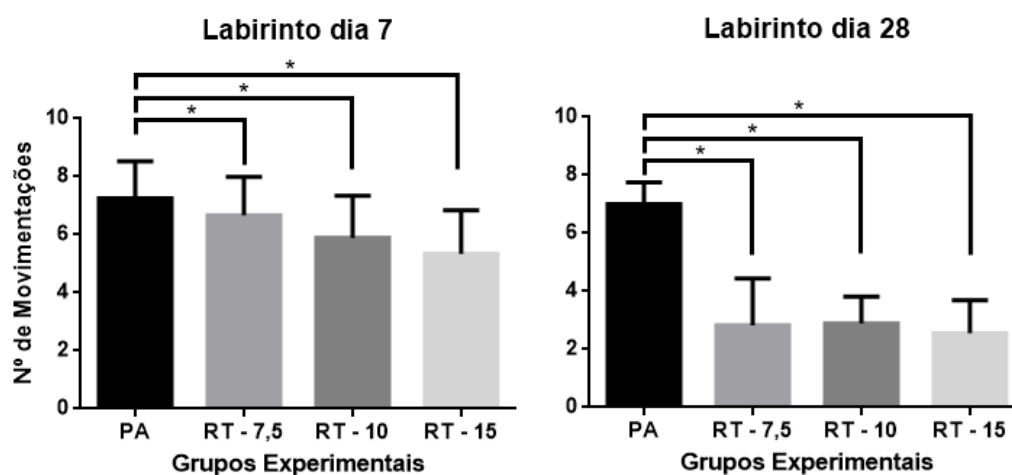
Figura 12 – Representação gráfica da avaliação de labirinto em Y no início do experimento dos grupos irradiados comparados com o Controle-PA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 7 dias do experimento verificou-se que os animais do grupo Controle-PA apresentavam média $7,25 \pm 1,282$ de movimentações diferindo estatisticamente na avaliação de labirinto dos grupos irradiados: RT-7,5 $6,667 \pm 1,323$; RT-10 $5,889 \pm 1,453$ e RT-15 $5,333 \pm 1,5$ ($p=0,0396$) ($p>0,05$). No dia 28 do experimento os animais que receberam a RT se movimentaram menos RT-7,5 $2,833 \pm 1,602$; RT-10 $2,889 \pm 0,928$ e RT-15 $2,556 \pm 1,13$ e foram significativamente diferentes do grupo Controle-PA $7 \pm 0,7559$ ($p<0,0001$) ($p>0,05$) (Figura 13).

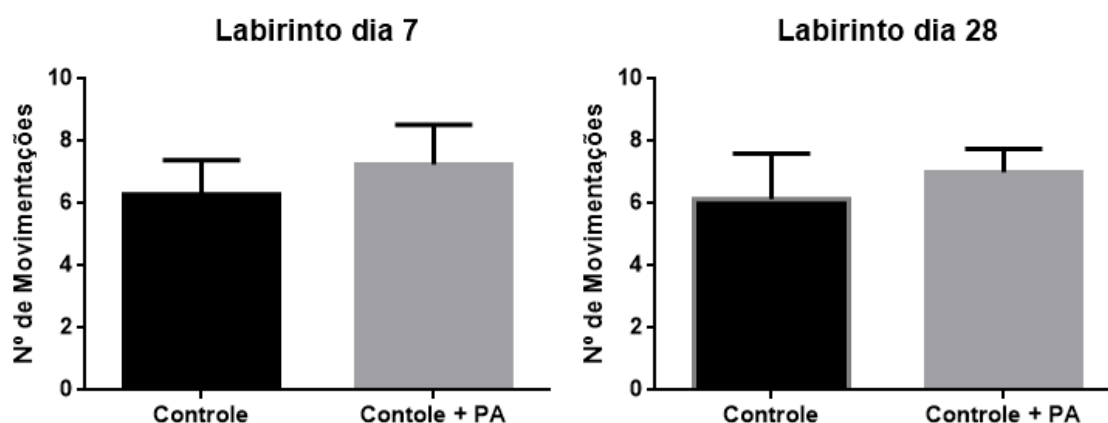
Figura 13 – Representação gráfica da avaliação de labirinto em Y nos dias 7 e 28 (final do experimento) dos grupos irradiados comparados com os não irradiados onde o (*) representa diferença estatística.



Verifica-se que no dia 7 e no final do experimento (dia 28) os grupos irradiados se movimentaram menos, quando comparados com o não irradiado onde o (*) representa diferença estatística.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao comparar os grupos controle entre si, não foi encontrado diferença estatística em nenhum período em relação a avaliação de labirinto, ou seja, o grupo controle (sem PA e sem RT) foi semelhante ao Controle-PA (sem RT) (Figura 14).

Figura 14 – Representação gráfica da avaliação de labirinto 7 dias após a RT e no dia 28 (final do experimento) do grupo controle (sem RT e sem PA) comparado com o grupo Controle-PA (sem RT).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Análise radiográfica

Foram verificadas diferenças estatísticas quanto a área da lesão periapical entre o grupo RT-15 e o grupo Controle-PA (sem RT) ($p=0,0187$) ($p>0,05$). A radiografia foi capaz de mostrar que a radioterapia causou maior destruição óssea no grupo RT-15 e que esse fato é proporcional a dose de irradiação, entretanto não foi possível verificar diferença entre os demais grupos (Tabela 1) (Figura 15).

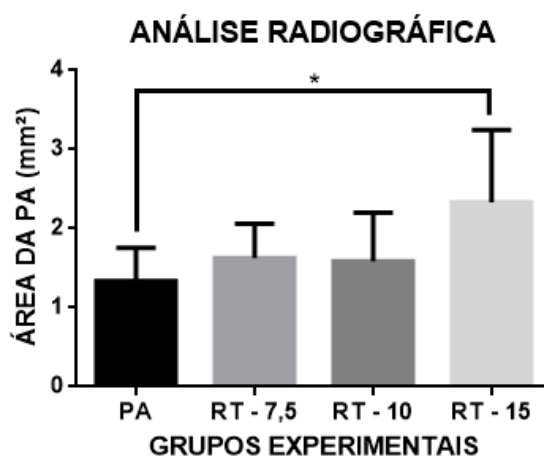
Tabela 1 – Área da lesão periapical

		Controle+PA	RT-7,5	RT-10	RT-15
Área da Lesão	Média ±	1,338 ±	1,625 ±	1,587 ±	2,331 ±
Periapical (mm ²)	DP	0,4197a	0,4358a	0,615a	0,917b

Média e Desvio Padrão (DP) onde *Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

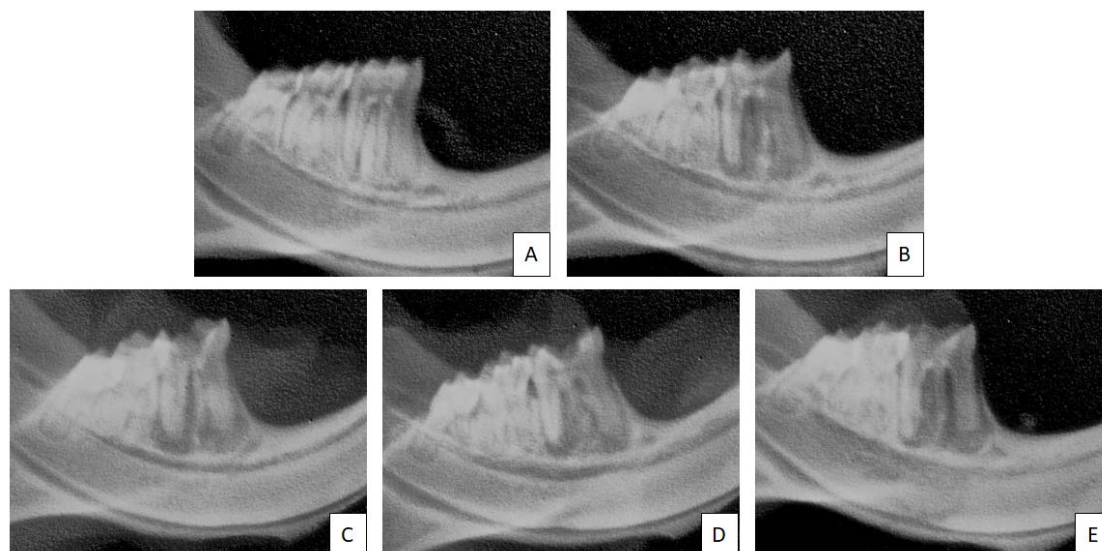
Figura 15 – Representação gráfica da área da lesão média referente a avaliação radiográfica dos grupos irradiados comparados ao grupo Controle-PA (sem RT).



(*) representa diferença estatística
Fonte: Elaborada pelo autor.

Verificou-se que a destruição óssea periapical foi mais extensa nos grupos irradiados, invadindo a região de furca. No entanto, visualmente todas as destruições ósseas se assemelham. A Figura 16 ilustra uma radiografia de cada um dos diferentes grupos de estudo.

Figura 16 – Imagens radiográficas representativas de lesão periapical do primeiro molar inferior de ratos, de acordo com os grupos avaliados.



a) Grupo controle; b) Controle-PA; c)RT-7,5; d)RT-10; E)RT-15

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Análise microtomográfica

Na análise de micro-CT, verificou-se que a radioterapia causou maior destruição óssea periapical e que esta foi proporcional a dose de irradiação. Verificou-se que no grupo RT-15 essa destruição foi maior e diferiu estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,0001$) ($p > 0,05$). Isso foi confirmado por uma análise microtomográfica detalhada da proporção de volume ósseo/volume tecidual da área da lesão periapical do terço apical da raiz mesial dos primeiros molares incluindo o grupo sem radioterapia (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores obtidos pela análise microtomográfica do volume da lesão periapical e de proporção entre volume ósseo e volume tecidual (média e desvio-padrão)

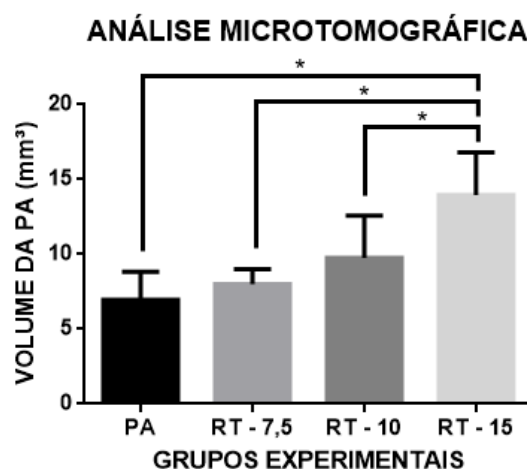
Grupos	Proporção BV/TV (%) $\pm$ DP	Volume da Lesão (mm ³) $\pm$ DP
Controle-PA	9,167 $\pm$ 4,971 ^a	6,386 $\pm$ 1,915 ^a
RT-7,5	4,324 $\pm$ 1,46 ^a	7,666 $\pm$ 0,9245 ^a
RT-10	8,278 $\pm$ 4,994 ^a	9,025 $\pm$ 2,79 ^a
RT-15	8,763 $\pm$ 3,899 ^a	12,74 $\pm$ 2,66 ^b

Média e Desvio Padrão (DP) onde letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 17 ilustra graficamente o volume das lesões periapicais nos diferentes grupos.

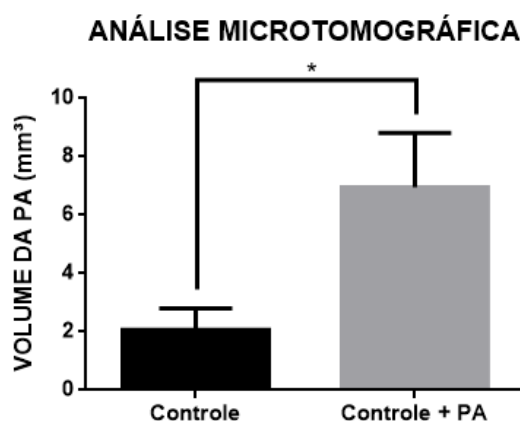
Figura 17 – Representação gráfica da avaliação microtomográfica dos grupos irradiados comparados com o não irradiado onde o (*) representa diferença estatística.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao comparar os grupos Controle (sem RT e sem PA) e o Controle-PA (sem RT), verificou-se a presença de lesão somente no grupo Controle-PA, levando a uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$) ($p > 0,05$) (Figura 18)

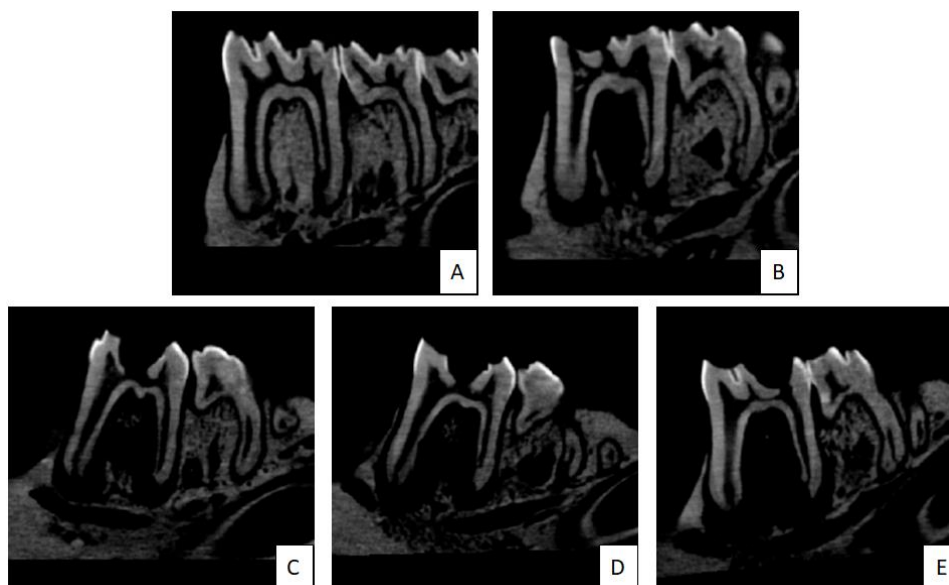
Figura 18 – Representação gráfica da avaliação microtomográfica do grupo controle com o grupo Controle-PA onde o (*) representa diferença estatística.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Verificou-se que a destruição óssea periapical foi muito extensa, invadindo a região de furca nos grupos irradiados, atingindo grandes proporções. Essa destruição foi proporcional a dose de RT. A Figura 19 ilustra a região da destruição óssea periapical nos diferentes grupos de estudo.

Figura 19 – Representação 2D da região de destruição óssea durante avaliação microtomográfica de todos os grupos de estudo.



A) Grupo controle; B) Controle-PA; C) RT-7,5; D) RT-10; E) RT-15

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 Análise histológica

As evidências do processo inflamatório foram observadas em todos os grupos e verificou-se que essa inflamação estava associada a áreas de reabsorção óssea nos grupos que receberam indução de PA. Referente a intensidade do processo inflamatório houve diferença estatística significativa entre grupo RT-15 em comparação aos demais grupos ($p=0,0089$) ($p>0,05$) uma vez que verificou-se score 4 (maior intensidade de células inflamatórias) em 7 dos 9 espécimes do grupo RT-15.

Quando avaliou-se a extensão do infiltrado inflamatório, o grupo RT-15 também apresentou score máximo (células que ocuparam um comprimento maior que $600\mu\text{m}$) em 7 dos 9 espécimes do grupo. Assim, RT-15 foi estatisticamente diferente dos grupos RT-7,5 e Controle-PA ($p=0,0018$) ($p>0,05$).

Ao avaliar as lesões periapicais, as mesmas apresentaram principalmente característica de granuloma periapical caracterizado por um tecido granulomatoso constituído predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos ao redor do ápice dentário, levando a reabsorção óssea e do ápice radicular. Em muitos casos, verificou-se presença de abscessos circunscritos por leucócitos polimorfonucleares, relacionados ao forame apical. Ao redor desses abscessos, quando presentes, havia presença do tecido granulomatoso.

Histometricamente, observou-se que a área da lesão periapical foi significativamente maior no grupo RT-15 em relação aos demais grupos ($p < 0,0001$) ($p > 0,05$). Verificou-se que nesse grupo (RT-15), a área da lesão dobrou de tamanho em relação aos demais grupos.

A tabela 3 mostra os dados referentes a intensidade e extensão do processo inflamatório e área da lesão periapical e a figura 20 ilustra esses resultados.

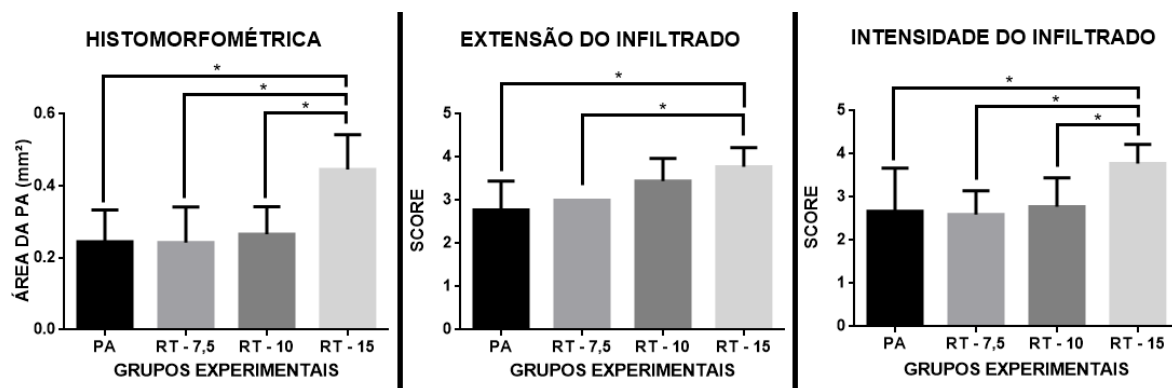
Tabela 3 – Scores, Mediana, Média e Desvio padrão (DP) dos achados histológicos, referente a lesão periapical de todos os grupos.

Parâmetros Histológicos	Scores	Grupos Experimentais			
		Controle+PA	RT-7,5	RT-10	RT-15
Intensidade do Infiltrado Inflamatório	1	1/9	0/9	0/9	0/9
	2	3/9	4/9	3/9	0/9
	3	3/9	5/9	5/9	2/9
	4	2/9	0/9	1/9	7/9
	Mediana	3a	3a	3a	4b
Extensão do infiltrado Inflamatório	1	1/9	0/9	0/9	0/9
	2	0/9	0/9	0/9	0/9
	3	8/9	9/9	5/9	2/9
	4	0/9	0/9	4/9	7/9
	Mediana	3a	3a	3a	4b
Área da Lesão Periapical (mm ²)	Média ±	0,245 ±	0,2428 ±	0,2657 ±	0,4458 ±
	DP	0,08836a	0,09872a	0,07629a	0,09643b

*Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

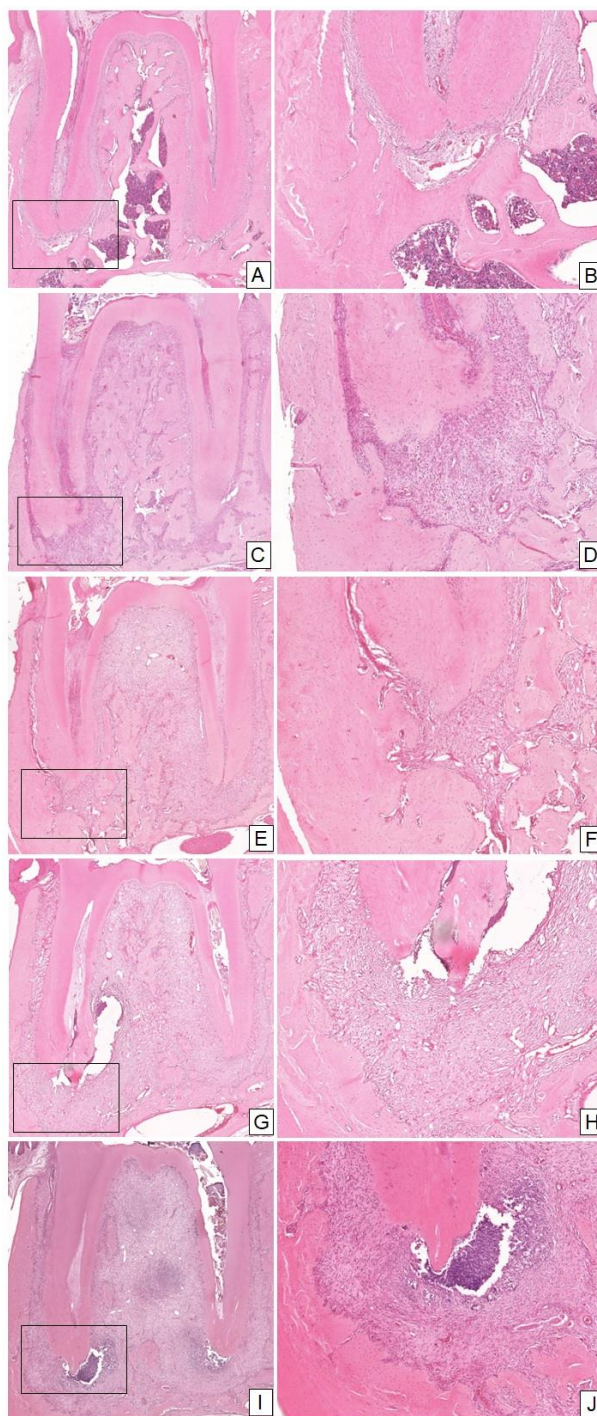
Figura 20 – Representação gráfica da avaliação histomorfométrica, extensão e intensidade do infiltrado inflamatório onde o (*) representa diferença estatística.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 21 mostra os aspectos histológicos da lesão periapical nos grupos estudados .

Figura 21 – Aspectos histológicos das lesões periapical de todos os grupos.



Coloração por hematoxilina e eosina: A) Grupo controle; C) Controle-PA; E) RT-7,5; G) RT-10; I) RT-15 em um aumento de 2x e B, D, F, H e J representam um aumento em 10x da região selecionada respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Esse projeto foi realizado com o objetivo de avaliar a dosagem mais adequada de radioterapia a ser utilizada em estudos para avaliar a progressão e reparo de lesões endodônticas após radioterapia utilizando ratos como modelo animal. Observa-se na literatura que os estudos que realizam radioterapia em ratos, são para finalidades não endodônticas; além disso, existem muitas divergências nas doses de radiação (Özer et al., 2016; Kim et al., 2017; Araujo et al., 2018; Özgür et al., 2019; Yamasaki et al., 2020), o que dificulta o estabelecimento de um protocolo adequado para avaliação dos efeitos deste tratamento. Devido a falta de estudos desta natureza na endodontia, avaliando os efeitos da radioterapia na lesão periapical, neste estudo avaliou-se diferentes doses e os efeitos das mesmas sobre os tecidos periapicais.

Na radiação ionizante, a “dose absorvida” ou simplesmente “dose” é definido pela *International Commission on Radiation Units and Measurements* (Report 85 – ICRU) como: “A dose absorvida, D , é o quociente de $d\epsilon$ por dm , onde $d\epsilon$ é a energia média transmitida pela radiação ionizante para a matéria de massa dm ”. Ou seja, $D = d\epsilon/dm$, cuja unidade é dada em energia por unidade de massa (J/kg), que recebe o nome especial gray (Gy) no Sistema Internacional de unidades (SI). Sendo assim, o próprio conceito de dose de radiação já traz em si a ponderação pela massa de tecido irradiada, quando divide a energia depositada ($d\epsilon$) pela massa de matéria irradiada. Como consequência desse fato, torna-se desnecessário ponderar “dose absorvida” em função da massa do paciente, ou seja, 60 Gy (6000 cGy) de dose absorvida no tecido de um paciente ou 60 Gy de dose absorvida no tecido de um rato Wistar, correspondem, em ambos os casos, a 60 joules de energia depositada por kg de tecido irradiado.

A grande questão que suscitou essa pesquisa refere-se à distribuição desta dose nos tecidos irradiados e não-irradiados. A radiação ionizante afeta os tecidos por meio de alterações no nível celular por efeitos diretos (no DNA celular) ou efeitos indiretos (formação de biomoléculas nocivas como por exemplo, H_2O_2). Quando a um paciente é receitado um tratamento de 60 Gy, esta receita especifica a dose para o tecido tumoral apenas, e não para todo o organismo do paciente (caso em que ele com certeza iria a óbito). Portanto, previamente a realização da RT, existe uma etapa denominada “planejamento radioterápico” que consiste em “planejar” o conjunto de incidências, angulações, tempos e intensidades de feixes de radiação que, combinados, maximizem a dose no tecido tumoral (60 Gy, por exemplo) e minimizem a dose nos tecidos adjacentes, de maneira a minimizar os efeitos sistêmicos no organismo do paciente como um todo.

Assim, para cada tipo, volume e posição de tumor, há uma diferente distribuição de dose nos tecidos adjacentes da cabeça e pescoço (diferentes planejamentos radioterápicos), nunca chegando estas, próximas à dose no tecido tumoral. Estas diferentes doses nos tecidos adjacentes são compostas pelos próprios feixes diretos utilizados no processo de irradiação, que necessitam atravessar tecidos sadios para chegar à região do tecido tumoral, bem como à radiação espalhada nas estruturas do próprio organismo. Tais diferenças não estão bem estabelecidas ou justificadas nos trabalhos da literatura que utilizam ratos como modelo animal onde observa-se doses variando de 5 Gy a 30 Gy em diferentes tecidos e situações na região de cabeça e pescoço (glândulas salivares, cérebro, etc) (Özer et al., 2016; Kim et al., 2017; Xu et al., 2017; Araujo et al., 2018; Özgür et al., 2019; Abdel-Magied et al., 2019; Yamasaki et al., 2020). No entanto, não existem dados sobre os efeitos da RT na lesão periapical.

Desta forma, a irradiação com doses de 7,5 Gy, 10 Gy, 15 Gy e 30 Gy, proposta no presente estudo, teve como objetivo “mapear” o comportamento do tecido irradiado nesse intervalo de dose, permitindo uma melhor compreensão das consequências de cada faixa de dose na progressão da PA.

Verificou-se que após 5 dias da RT, os animais irradiados com 30 Gy apresentaram uma piora na saúde geral observado clinicamente como alterações na pelagem, dificuldade de abrir os olhos, cavidade oral com múltiplas lesões, respiração comprometida, emissão de sons diferentes dos outros animais além de redução no consumo de água e ração. Verificou-se que essa condição piorou progressivamente com o passar dos dias, ocorrendo óbitos diários dos animais. Assim, nenhum animal desse grupo (30Gy) conseguiu sobreviver até o dia da eutanásia para a coleta de mandíbula e análise de resultados.

Assim, os resultados expressos foram referentes aos animais submetidos a dosagens de radiação de 15 Gy, 10 Gy e 7,5 Gy e dos animais dos grupos controle (sem RT e sem PA e sem RT e com PA). De acordo com os resultados apresentados referente a análise comportamental, foi possível perceber que apenas a indução da lesão não é capaz de gerar um comprometimento do comportamento dos animais, visto que não houve diferença entre o grupo controle sem qualquer tratamento e o grupo controle somente com lesão periapical.

Referente ao peso dos animais, verificou-se que o peso inicial foi semelhante para todos os animais mostrando que a amostra foi semelhante para todos os grupos. No entanto, após 7 dias, foi possível observar que os animais submetidos a RT apresentaram menor ganho de peso do que os animais do grupo Controle-PA sem RT. No entanto, embora o ganho médio de peso dos animais RT 15 Gy tenha sido muito baixo 7 dias após a RT, não se verificou diferenças significantes em relação aos demais grupos. Isso provavelmente se deve ao desvio padrão muito alto; provavelmente se fosse retirado um animal

com peso muito maior que a média, essa diferença seria estatisticamente significativa.

Quanto ao comportamento dos animais verificou-se que a RT altera o comportamento dos mesmos. Após diferentes dosagens de RT, verificou-se que tanto no dia 7 como ao final do experimento (dia 28), os animais dos grupos submetidos a RT apresentaram desempenho significativamente menor do que os grupos sem RT tanto na avaliação de campo aberto quanto na avaliação pelo teste do labirinto. Verificou-se que os animais até melhoraram seu desempenho ao longo do tempo, mostrando uma recuperação dos efeitos da RT mas estes animais não retornaram ao desempenho normal comparados ao grupo controle. O que mostra que a RT leva a alterações comportamentais que não reverterem totalmente com o passar do tempo. Isso permite afirmar que a RT é um tratamento debilitante da condição sistêmica do indivíduo causando um comportamento depressivo. No entanto, não é possível comparar os resultados desse estudo com outros da literatura pois até o momento não existem estudos sobre o efeito da RT no comportamento dos animais.

Em relação as doses de irradiação, foi possível perceber que quanto maior a dose aplicada, pior o estado de saúde geral dos animais uma vez que, observou-se que quanto maior a dose de RT, menor a movimentação dos animais quando os testes de campo aberto e labirinto “Y” foram realizados. Entretanto, estatisticamente não houve uma diferença capaz de sugerir uma relação dose dependente quanto a movimentação dos animais. Da mesma forma, verificou-se que o quanto maior o peso, menor a dose de radiação. Numericamente foi muito nítida esta diferença, no entanto, não houve diferença significativa provavelmente devido ao grande desvio padrão dos grupos, especialmente do grupo controle.

A análise radiográfica teve como objetivo apenas avaliar comparativamente a destruição periapical observada na radiografia coma detectada na

microtomografia, uma vez que, na clínica, o paciente que está sob tratamento radioterápico por estar sendo submetido a muitos exames, é conduta comum a realização de exame radiográfico evitando-se a tomografia. Verificou-se que houve diferença significativa quando comparado o grupo RT-15 com o grupo controle sem irradiação com lesão, esse resultado mostra que a análise radiográfica é menos detalhada, mas pode ser realizada como parâmetro para avaliar a extensão da PA. No entanto, a microtomografia, ou tomografia em pacientes, se faz necessária para que o planejamento de tratamento seja mais preciso, já que em sua avaliação é possível ter uma visão tridimensional da lesão.

Verificou-se na análise de micro-CT que a RT interfere significativamente no desenvolvimento e tamanho da lesão periapical e esse aumento da lesão é proporcional a dose de radiação. Verificou-se diferença estatística no volume da lesão periapical quando se comparou o grupo RT-15 com os demais grupos irradiados e grupo controle sem irradiação e com lesão PA.

A dose dependência fica evidente através da análise de microtomografia. Foi possível perceber que quanto maior a dose de radiação maior é o tamanho da lesão periapical uma vez que o volume da lesão no grupo RT-15 foi estatisticamente diferente dos demais grupos de radiação e ao grupo controle sem irradiação e com lesão periapical.

A relação dose de radiação com o volume da lesão periapical ainda não foi estudada na Endodontia o que não permite comparar os resultados desse estudo com outros. A literatura atual é focada no reparo ósseo frente a RT em outras especialidades como a implantodontia, onde se visa a osseointegração de implantes e essa metodologia utiliza de outras regiões dos animais que não a região de cabeça e pescoço (Zhang et al., 2010).

Na análise histológica, verificou-se que animais submetidos a dose de 15Gy apresentaram maior severidade e extensão do processo inflamatório.

Verificou-se também que vários dentes dos grupos RT-15 e RT-10, apresentavam abscessos no interior do tecido granulomatoso; esses abscessos estavam mais relacionados a fonte antigênica do canal radicular. Diversos estudos comprovam que as periodontites apicais são dependentes da presença das bactérias presentes no interior dos canais radiculares (Nair, 2006 e 1997). Além disso, as citocinas inflamatórias desempenham o primordial fator no desenvolvimento das lesões periapicais e são responsáveis pela ação de células inflamatórias. Após RT o osso é alterado no suprimento vascular, aumentando a permeabilidade vascular, com consequente aumento no edema perivascular, hemorragia de pequenos vasos e oclusão vascular. Esses efeitos no tecido ósseo são permanentes (Pitkänen, Hopewell, 1983) e assim essa alteração óssea gera uma resposta exacerbada no processo inflamatório dos tecidos periapicais do osso irradiado, o que pode ser observado no presente estudo.

Ao analisar o perfil inflamatório é possível perceber que a extensão do infiltrado do grupo RT-10 foi semelhante ao grupo RT-15, entretanto a intensidade inflamatória foi menor no grupo RT-10, o que sugere que a cada aumento de dosagem há em conjunto uma mudança no perfil inflamatório dessas lesões.

Quando se avalia as imagens histológicas essa similaridade entre os grupos (RT-10 e RT-15) é bem visual. Ambos apresentam espécimes contendo áreas de abscesso, no entanto o grupo RT-15 apresentou intensidade e extensão máxima do processo inflamatório em 7 dos 9 espécimes, com 100% das lesões atingindo a furca.

Assim, fica claro que, se a cárie dentária atingir o tecido pulpar e, por consequência levar ao desenvolvimento de PA em uma região submetida a RT, essa destruição periapical terá sua progressão aumentada podendo atingir grandes magnitudes.

Uma vez que a proposta desse estudo foi avaliar o efeito da RT no

desenvolvimento da PA e qual a melhor dosagem de RT para estudos na área de endodontia, verifica-se que a RT interfere sim na progressão da PA e que a dosagem de 15Gy é a mais adequada para estudos na endodontia. Uma vez que a mesma não leva o animal a óbito, diminui a movimentação animal de forma semelhante a outras dosagens de RT e mostra diferença significativa no desenvolvimento da PA quando comparada ao grupo controle.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que:

- A dose de irradiação de 30 Gy é letal para ratos Wistar quando administradas na região de cabeça e pescoço, não devendo assim ser utilizada em trabalhos na área de endodontia;
- A RT altera o comportamento dos animais piorando a qualidade de vida dos mesmos;
- O volume da lesão periapical foi proporcional a dose de RT sendo que quanto maior a dose, maior o volume da PA; a dose única de 15 Gy aumentou estatisticamente o volume da PA;
- A intensidade do processo inflamatório e sua extensão também foi proporcional a dose de irradiação;
- A RT com dose única de 15 Gy na região de cabeça e pescoço de ratos Wistar é a melhor dose a ser utilizada como protocolo para trabalhos futuros semelhantes na endodontia.

REFERÊNCIAS*

Abdel-Magied N, Shedid SM, Ahmed AG. Mitigating effect of biotin against irradiation-induced cerebral cortical and hippocampal damage in the rat brain tissue. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019 May;26(13):13441-13452. doi: 10.1007/s11356-019-04806-x. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30911963.

Agalliu I, Gapstur S, Chen Z, Wang T, Anderson RL, Teras L, et al. Associations of Oral α -, β -, and γ -Human Papillomavirus Types With Risk of Incident Head and Neck Cancer. *JAMA Oncol*. 2016 May 1;2(5):599-606. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5504. PMID: 26794505; PMCID: PMC4956584.

Al-Nawas B, Grötz KA. Prospective study of the long term change of the oral flora after radiation therapy. *Support Care Cancer*. 2006 Mar;14(3):291-6. doi: 10.1007/s00520-005-0895-3. Epub 2005 Nov 30. PMID: 16341728.

American Cancer Society. Risk Factors for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers [Internet]. [cited 2019 Set 23]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>

Araujo MVT, Spadella MA, Chies AB, Arruda GV, Santos TM, Cavariani MM, et al. Effect of low radiation dose on the expression and location of aquaporins in rat submandibular gland. *Tissue Cell*. 2018 Aug;53:104-110. doi: 10.1016/j.tice.2018.06.006. Epub 2018 Jul 6. PMID: 30060820.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008 May 17;371(9625):1695-709. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60728-X. PMID: 18486742; PMCID: PMC7720415.

Belibasakis GN, Meier A, Guggenheim B, Bostanci N. Oral biofilm challenge regulates the RANKL-OPG system in periodontal ligament and dental pulp cells. *Microb Pathog*. 2011 Jan;50(1):6-11. doi: 10.1016/j.micpath.2010.11.002. Epub 2010 Nov 12. PMID: 21075196.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011 Feb;26(2):229-38. doi: 10.1002/jbmr.320. PMID: 21254230; PMCID: PMC3179345.

Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*. 2013 Oct;92(10):860-7. doi: 10.1177/0022034513500306. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23906603; PMCID: PMC3775372.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):139-46. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.018. Epub 2008 Mar 25. PMID: 18395508; PMCID: PMC2413418.

Chen S, Lei H, Luo Y, Jiang S, Zhang M, Lv H, et al. Micro-CT analysis of chronic apical periodontitis induced by several specific pathogens. *Int Endod J*. 2019 Jul;52(7):1028-1039. doi: 10.1111/iej.13095. Epub 2019 Feb 25. PMID: 30734930.

Cihan YB, Cihan C, Mutlu H, Unal D. Effect of royal jelly on serum trace elements in rats undergoing head and neck irradiation. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2013 Jan-Feb;23(1):37-43. doi: 10.5606/kbbihtisas.2013.77753. PMID: 23521411.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in

normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2014 Dec;18(9):2123-8. doi: 10.1007/s00784-014-1192-7. Epub 2014 Jan 25. PMID: 24464218.

da Cruz Vegian MR, Costa BCA, de Fátima Santana-Melo G, Godoi FHC, Kaminagakura E, Tango RN, et al. Systemic and local effects of radiotherapy: an experimental study on implants placed in rats. *Clin Oral Investig*. 2020 Feb;24(2):785-797. doi: 10.1007/s00784-019-02946-5. Epub 2019 Jun 1. PMID: 31154539.

Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev*. 2013 Oct;34(5):658-90. doi: 10.1210/er.2012-1026. Epub 2013 Apr 23. PMID: 23612223; PMCID: PMC3785641.

Elsaadany B, Zakaria M, Mousa MR. Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Preserve the Salivary Glands Structure after Head and Neck Radiation in Rats. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019 May 28;7(10):1588-1592. doi: 10.3889/oamjms.2019.350. PMID: 31210805; PMCID: PMC6560309.

Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdel-Rahman O, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2019 Dec 1;5(12):1749-1768. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.2996. Erratum in: *JAMA Oncol*. 2020 Mar 1;6(3):444. Erratum in: *JAMA Oncol*. 2020 May 1;6(5):789. Erratum in: *JAMA Oncol*. 2021 Mar 1;7(3):466. PMID: 31560378; PMCID: PMC6777271.

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1):176-90. doi: 10.1002/dvdy.20603. PMID: 16258960.

Godoi, FHC. Correlação entre os efeitos da radioterapia sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais na instalação de implantes [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2018.

Grégoire V, Lefebvre JL, Licitra L, Felip E; EHNS-ESMO-ESTRO Guidelines Working Group. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 5:v184-6. doi: 10.1093/annonc/mdq185. PMID: 20555077.

Hommeze GM, De Meerleer GO, De Neve WJ, De Moor RJ. Effect of radiation dose on the prevalence of apical periodontitis--a dosimetric analysis. *Clin Oral Investig*. 2012 Dec;16(6):1543-7. doi: 10.1007/s00784-011-0665-1. Epub 2012 Jan 6. PMID: 22219024.

Hsieh CH, Hou ML, Chiang MH, Tai HC, Tien HJ, Wang LY, et al. Head and neck irradiation modulates pharmacokinetics of 5-fluorouracil and cisplatin. *J Transl Med*. 2013 Sep 26;11:231. doi: 10.1186/1479-5876-11-231. PMID: 24066670; PMCID: PMC3853440.

INCA, Instituto Nacional Do Câncer. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from <https://www.inca.gov.br/estimativa>.

Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J Periodontal Res.* 2011 Apr;46(2):153-7. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01331.x. Epub 2010 Dec 1. PMID: 21118418.

Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol.* 2010 Nov 8;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5532. PMID: 21523224; PMCID: PMC3084575.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340-9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0. PMID: 14342926.

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008 Apr;29(2):155-92. doi: 10.1210/er.2007-0014. Epub 2007 Dec 5. PMID: 18057140; PMCID: PMC2528846.

Khan F. The physics of radiation therapy. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

Khoury RD, Prado RFD, Matos FS, Meireles BR, Cardoso FGDR, Oliveira LD, et al. The influence of adrenergic blockade in rats with apical periodontitis under chronic stress conditions. *Arch Oral Biol.* 2020 Feb;110:104590. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104590. Epub 2019 Oct 20. PMID: 31743801.

Kim JH, Jung MH, Kim JP, Kim HJ, Jung JH, Hahm JR, et al. Alpha lipoic acid attenuates radiation-induced oral mucositis in rats. *Oncotarget.* 2017 Aug

16;8(42):72739-72747. doi: 10.18632/oncotarget.20286. PMID: 29069822; PMCID: PMC5641165.

Loganadane G, Kann BH, Park HS, Johnson SB, Mehra S, Judson BL, et al. Clinical Outcomes of Head and Neck Cancer Patients Who Undergo Resection, But Forgo Adjuvant Therapy. *Anticancer Res.* 2019 Sep;39(9):4885-4890. doi: 10.21873/anticanres.13674. PMID: 31519591.

Lotan A, Lifschytz T, Wolf G, Keller S, Ben-Ari H, Tatarsky P, et al. Differential effects of chronic stress in young-adult and old female mice: cognitive-behavioral manifestations and neurobiological correlates. *Mol Psychiatry.* 2018 Jun;23(6):1432-1445. doi: 10.1038/mp.2017.237. Epub 2017 Dec 19. PMID: 29257131.

Lukić A, Vojvodic D, Majstorović I, Colić M. Production of interleukin-8 in vitro by mononuclear cells isolated from human periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Oct;21(5):296-300. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00293.x. PMID: 16922928.

Maeda SS, Silva DMW. *Guia Prático em Osteometabolismo.* São Paulo: Segmento Farma, 2014.

Marques MA, Dib LL. Periodontal changes in patients undergoing radiotherapy. *J Periodontol.* 2004 Sep;75(9):1178-87. doi: 10.1902/jop.2004.75.9.1178. PMID: 15515331.

Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000 Jun;15(3):139-50. doi: 10.1034/j.1399-302x.2000.150301.x. PMID: 11154396.

Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):155-63. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.036. Epub 2013 Dec 15. PMID: 24461396.

Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Fernando Zambuzzi W, et al. Receptor activator NFkappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Sep;102(3):404-9. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.10.054. Epub 2006 Apr 21. PMID: 16920551.

Ministério da Saúde. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Cabeça e Pescoço [Internet]. Brasília (DF) [cited 2015 Jun 17]. Available from:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt0516_17_06_2015.html

Ministério da Saúde. Radioterapia de Intensidade Modulada para Tumores de Cabeça e Pescoço [Internet]. Brasília (DF) [cited 2017 Apr]. Available from: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2017/Recomendacao/Relatorio_IMRT_TumorCabecaPescoco_final.pdf

Nagler RM. Extended-term effects of head and neck irradiation in a rodent. *Eur J Cancer*. 2001 Oct;37(15):1938-45. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00213-1. PMID: 11576851.

Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000. 1997 Feb;13:121-48. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00098.x. PMID: 9567926.

Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*. 2006 Apr;39(4):249-81. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x. PMID: 16584489.

Nakahama K. Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Dec;67(23):4001-9. doi: 10.1007/s00018-010-0479-3. Epub 2010 Aug 8. PMID: 20694737.

Ohshima M, Yamaguchi Y, Micke P, Abiko Y, Otsuka K. In vitro characterization of the cytokine profile of the epithelial cell rests of Malassez. *J Periodontol*. 2008 May;79(5):912-9. doi: 10.1902/jop.2008.070553. PMID: 18454671.

Ollivier L, Brisse H, Leclère J. Bone marrow imaging: follow-up after treatment in cancer patients. *Cancer Imaging*. 2002; 2(2): 90–2. doi: 10.1102/1470-7330.2002.0007. PMCID: PMC4554688.

Özer MA, Polat N, Özen S, Parlakpınar H, Ekici K, Polat A, et al. Effects of Molsidomine on Retinopathy and Oxidative Stress Induced by Radiotherapy in Rat Eyes. *Curr Eye Res*. 2017 May;42(5):803-809. doi: 10.1080/02713683.2016.1238943. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27897441.

Özgür A, Terzi S, Özdemir D, Tümkaya L, Rakıcı S, Mercantepe T, et al. Protective Effect of Whortleberry Extract on Salivary Gland Damage Induced by Neck Irradiation in Rats. *Ear Nose Throat J*. 2019 Jul;98(6):E64-E69. doi: 10.1177/0145561319846868. Epub 2019 Apr 28. PMID: 31032661.

Pinto KP, Ferreira CMA, Guimarães AFC, Lima CO, Pires FR, Sassone LM, et al. Effects of alcohol and nicotine consumption on the development of apical periodontitis in rats: a correlative micro-computed tomographic, histological and

immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2020 Sep;53(9):1238-1252. doi: 10.1111/iej.13344. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32516436.

Pitkänen MA, Hopewell JW. Functional changes in the vascularity of the irradiated rat femur. Implications for late effects. *Acta Radiol Oncol*. 1983;22(3):253-6. doi: 10.3109/02841868309134038. PMID: 6312765.

Puri DR, Chou W, Lee N. Intensity-modulated radiation therapy in head and neck cancers: dosimetric advantages and update of clinical results. *Am J Clin Oncol*. 2005 Aug;28(4):415-23. doi: 10.1097/01.coc.0000162443.08446.00. PMID: 16062086.

Schuurhuis JM, Stokman MA, Witjes MJH, Reintsema H, Langendijk JA, Vissink A, et al. Patients with advanced periodontal disease before intensity-modulated radiation therapy are prone to develop bone healing problems: a 2-year prospective follow-up study. *Support Care Cancer*. 2018 Apr;26(4):1133-1142. doi: 10.1007/s00520-017-3934-y. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29090383; PMCID: PMC5847027.

Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port*. 2011 Jul-Sep;36(3):209-18. PMID: 22113597.

Smith J, Nastasi D, Tso R, Vangaveti V, Renison B, Chilkuri M. The effects of continued smoking in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: A systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol*. 2019 Jun;135:51-57. doi: 10.1016/j.radonc.2019.02.021. Epub 2019 Mar 11. PMID: 31015170.

Song W, Guo Y, Jiang S, Wei L, Liu Z, Wang X, et al. Antidepressant Effects of the Ginsenoside Metabolite Compound K, Assessed by Behavioral Despair Test and Chronic Unpredictable Mild Stress Model. *Neurochem Res*. 2018

Jul;43(7):1371-1382. doi: 10.1007/s11064-018-2552-5. Epub 2018 May 22. PMID: 29790069.

Takeichi O, Hama S, Iwata K, Ito K. Confocal immunolocalization of VE-cadherin- and CXC chemokine-expressing endothelial cells in periapical granulomas. *Int Endod J*. 2008 May;41(5):401-7. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01369.x. Epub 2008 Feb 20. PMID: 18298575.

Talani C, Mäkitie A, Beran M, Holmberg E, Laurell G, Farnebo L. Early mortality after diagnosis of cancer of the head and neck - A population-based nationwide study. *PLoS One*. 2019 Oct 2;14(10):e0223154. doi: 10.1371/journal.pone.0223154. PMID: 31577831; PMCID: PMC6774523.

Titorencu I, Pruna V, Jinga VV, Simionescu M. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell Tissue Res*. 2014 Jan;355(1):23-33. doi: 10.1007/s00441-013-1750-3. Epub 2013 Nov 29. PMID: 24292720.

Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, León R, Chandía S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis*. 2006 May;12(3):283-9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01191.x. PMID: 16700737.

Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone*. 2004 Sep;35(3):629-35. doi: 10.1016/j.bone.2004.04.023. PMID: 15336598.

Wang L, Zhang R, Xiong H, Peng B. The involvement of platelet-derived growth factor-A in the course of apical periodontitis. *Int Endod J*. 2011 Jan;44(1):65-71. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01798.x. Epub 2010 Oct 11. PMID: 21039624.

Xu M, Fan Q, Zhang J, Chen Y, Xu R, Chen L, et al. NFAT3/c4-mediated excitotoxicity in hippocampal apoptosis during radiation-induced brain injury. *J Radiat Res*. 2017 Nov 1;58(6):827-833. doi: 10.1093/jrr/rrx041. PMID: 28992110; PMCID: PMC5710526.

Yamasaki MC, Roque-Torres GD, Peroni LV, Nascimento EHL, Salmon B, Oliveira ML, et al. A modified protocol of mandibular osteoradionecrosis induction in rats with external beam radiation therapy. *Clin Oral Investig*. 2020 Apr;24(4):1561-1567. doi: 10.1007/s00784-019-03054-0. Epub 2019 Aug 10. PMID: 31401733.

Yamasaki MC, Roque-Torres GD, Peroni LV, Nascimento EHL, Salmon B, Oliveira ML, et al. Does the administration of meloxicam before head and neck radiotherapy reduce the risk of mandibular osteoradionecrosis? An animal model study. *Clin Oral Investig*. 2021 Jun;25(6):3739-3745. doi: 10.1007/s00784-020-03701-x. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33387032.

Zhang WB, Zheng LW, Chua D, Cheung LK. Bone regeneration after radiotherapy in an animal model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Nov;68(11):2802-9. doi: 10.1016/j.joms.2010.04.024. Epub 2010 Aug 19. PMID: 20727641.

Zhang C, Yang L, Peng B. Critical role of NFATc1 in periapical lesions. *Int Endod J*. 2010 Feb;43(2):109-14. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01649.x. PMID: 20078699.

Zhong Y, Yu L, Zhao J, Fang Y, Yang Y, Wu Z, et al. Clinical Implementation of Automated Treatment Planning for Rectum Intensity-Modulated Radiotherapy Using Voxel-Based Dose Prediction and Post-Optimization Strategies. *Front Oncol.* 2021 Jun 24;11:697995. doi: 10.3389/fonc.2021.697995. PMID: 34249757; PMCID: PMC8264432.

ANEXO A —Certificado do Comitê de Ética



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



Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos
UNESP



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 13/2020, intitulado:- **Influência de diferentes doses de radiação no desenvolvimento de periodontite apical em ratos submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço** sob a responsabilidade de MARCIA CARNEIRO VALERA GARAKIS, tendo como colaboradores:- Gustavo Guimarães Guerrero e, Giovanna Mignoto, e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 19/10/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	19/10/2020 a 19/10/2022
Espécie/linhagem/raça	Ratas Heterogênico Wistar
Nº de Animais	54 ratos
Peso/Idade	60 dias / 300 grs.
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 19 de outubro de 2020


Profa.Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Vice-Coordenadora em exercício