

Validación semiológica y predictiva de un modelo animal de alteraciones orofaciales inducidas por radiación.

Coram Guevara^{1*}, Ricardo Cárdenas², Heberto Suarez-Roca², Norberto Andrade³, Miguel Peña⁴

1 Área de Biología Oral. Instituto de Investigaciones de la Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia.

2 Sección de Neurofarmacología y Neurociencias. Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette". Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

3 Departamento de Sistemas. Facultad de Odontología. Maracaibo-Venezuela.

4 Especialidad en Periodoncia. División de estudios para graduados. Facultad de odontología. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.

Correos electrónicos: guevaracoram@gmail.com, hsuarezroca@gmail.com, ricardojosecardenas@gmail.com, norbertojose051986@hotmail.com, miguel_p123_@hotmail.com

RESUMEN

Objetivo: Validar semiológicamente un modelo animal de cambios clínicos orofaciales en ratas tratadas con melatonina sometidas a radiación ionizante en la región mandibular. **Metodología:** ratas Sprague Dawley fueron sometidas a una sesión única de radiación de 50 Gy, siendo un grupo tratado con 50mg/kg de melatonina 30 minutos antes y después de la radiación mientras que otro grupo fue tratado con vehículo (Buffer fosfato salino) como control. De 1, 5 a 6 semanas después, se evaluó la presencia de los cambios clínicos de la mucosa oral postradiación. **Resultados:** Ambos grupos de animales irradiados evidenciaron pérdida de peso en la primera semana postradiación, al igual que signos de mucositis, xerostomía y alopecia. Los signos más graves de mucositis se presentaron en la primera semana, lo cual se correlaciona directamente con la pérdida de peso; disminuyendo progresivamente hasta estar ausente al final de la evaluación. La melatonina tiende a retardar el desarrollo de la xerostomía, así como también la alopecia entre los grupos irradiados, sin embargo no fue estadísticamente significativa. **Conclusión:** el modelo animal empleado fue capaz de reproducir lo que ocurre en pacientes sujetos a radioterapia, sugiriéndose como un modelo predictivo y válido para el estudio de la fisiopatología de los efectos secundarios causados por radiación.

Palabras clave: radiación ionizante, melatonina, alopecia, mucositis, xerostomía.

Autor de Correspondencia: Calle 65 con Av. 19. Edificio Ciencia Salud 3er Piso. Maracaibo, Venezuela.

Semiological and predictive validation of an animal model of orofacial alterations induced by radiation

ABSTRACT

Objective: To semiologically validate an animal model of orofacial clinical changes induced by radiation in the mandibular region of rats pre-treated with melatonin. **Methods:** Sprague-Dawley rats were exposed to a single 50 Gy radiation session; a group of animals received melatonin at a dose of 50 mg/kg 30 min before and 30 min after the radiation exposure, while another group was treated with saline (control). The presence of mucosal changes was evaluated 1.5 to 6 weeks after radiation exposure. **Results:** both groups of animals displayed weight loss during the first week after radiation exposure, as well as signs of mucositis, xerostomy and alopecia. The most severe signs of mucositis were present in the first week, which directly correlates with the weight loss; signs of mucositis diminished progressively, and were completely absent by the end of the study. Melatonin showed a tendency to delay the onset of xerostomy, as well as alopecia in the animals exposed to radiation; this effect, however, was not statistically significant. **Conclusion:** this animal model was able to reproduce the clinical manifestations observed in patients subjected to radiotherapy, thus suggesting its usefulness as a predictive model, valid for the study of the physiopathology of adverse reactions associated with radiation therapy.

Keywords: ionizing radiation, melatonin, alopecia, mucositis, xerostomia.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cabeza y cuello está representado por un grupo heterogéneo de neoplasias que comparten un origen anatómico común y una gran variedad de alteraciones moleculares capaces de influir en el comportamiento del tumor. Este tipo de patología es la 6^{ta} más común a nivel mundial, con un estimado de 633.000 casos y 355.000 muertes anuales¹. La mayoría de los cánceres de cabeza y cuello surgen en el revestimiento epitelial de la cavidad oral, la hipofaringe, la laringe y la orofaringe. Aproximadamente el 50% de todos los cánceres de cabeza y cuello se observan en la cavidad oral, siendo el carcinoma de células escamosas el tipo más frecuente, al representar aproximadamente el 90% de todos los cánceres de cabeza y cuello². El tratamiento para cáncer de cabeza y cuello involucra terapias generalmente multimodálicas, como cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de quimio y radioterapia^{3, 4}. La radioterapia (RT) se ha utilizado ampliamente como tratamiento primario y adyuvante, y a pesar de sus indudables efectos curativos, se observan algunos efectos secundarios

como consecuencia de la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO)⁵; estos efectos se pueden dividir en agudos y tardíos, siendo los agudos aquellos que se manifiestan durante o inmediatamente tras el tratamiento, como por ejemplo, mucositis, candidiasis, disgeusia, xerostomía y halitosis; mientras que, los tardíos como los que se desarrollan meses o años tras el mismo, incluyen caries por radiación, osteorradionecrosis (ORN), necrosis de tejidos blandos, pérdida de soporte periodontal y trismo^{6,7}.

En este sentido, los mecanismos por los cuales se induce la mucositis oral y la xerostomía en pacientes sometidos a radiación, están relacionados con los radicales libres o la generación de ERO las cuales causan daños colaterales en el tejido de la cavidad oral sano, incluidas las glándulas salivales. Por otra parte, la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) se considera una hormona y es sintetizada por la glándula pineal de mamíferos, glándula de Harder, el tracto gastrointestinal, los testículos y los linfocitos⁸⁻¹⁰. La melatonina (MLT), tiene efectos tanto inmunomoduladores y anti-inflamatorios como

antitumorales¹¹. Es el elemento principal del sistema de defensa contra especies reactivas de nitrógeno y de ERO^{12; 13}. La MLT y sus metabolitos son potentes antioxidantes, ya que son capaces de reducir el estrés oxidativo por varios mecanismos, directamente como capturador de radicales libres, por desintoxicación de oxidantes altamente reactivos con la donación de un electrón, mejorando la homeostasis mitocondrial y la regulación de genes mediante el aumento de la expresión de enzimas antioxidantes endógenas (como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa), además de la supresión de enzimas pro-oxidantes, protegiendo de esta manera el tejido sano en contacto con los radicales libres producto de la radiación¹⁵⁻¹⁶.

Actualmente, no existe un tratamiento adecuado para prevenir las alteraciones inducidas por radiaciones. Por lo tanto, es necesario desarrollar modelos animales que emulen los cambios clínicos observados en los humanos y que permitan evaluar agentes farmacológicos para tratar o prevenir los efectos adversos de las radiaciones. De esta manera, en este estudio se identificaron los cambios macroscópicos de las partes blandas en ratas sometidas a radiación y se compararon con los observados en pacientes sometidos a radioterapia de cabeza y cuello. Por otro lado, se validó el poder predictivo del modelo evaluando el efecto preventivo del tratamiento con melatonina. Se escogió la melatonina porque recientemente se ha comenzado a estudiar la posibilidad de utilizarla como tratamiento antioxidante y radioprotector en pacientes oncológicos¹⁷, para de esta manera reducir los efectos secundarios producidos tanto por quimio como radioterapia.

METODOLOGÍA:

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley, de 300-350 gramos, suministrados por el Bioterio de la Universidad de los Andes, (ULA, Mérida), los cuales fueron manipulados según las pautas de bioética de la guía internacional para el cuidado y uso de

animales de laboratorio. Los animales se mantuvieron enjaulados individualmente. La temperatura del cuarto se mantuvo a 24-26 oC y se garantizaron cambios/hora del aire del cuarto. La humedad se reguló y los ciclos de luz/oscuridad tuvieron duración de 12 horas, respectivamente. El agua y el alimento fueron suministrados ad libitum y los experimentos se realizaron durante el periodo de luz. El modelo experimental tuvo una duración de 6 semanas y los animales fueron sacrificados por medio de anestesia profunda, mediante la combinación de ketamina y xilacina.

Grupos experimentales:

Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales: Control negativo (PBS, n=6); animales que no fueron sometido a radioterapia (no expuestos) y que se inyectaron con buffer fosfato salino (PBS) vía intraperitoneal (i.p.). Control positivo (RT-PBS, n=6); animales que fueron sometidos a radioterapia (RT), y que se inyectaron con PBS vía i.p. media hora antes de ser sometidos a la prueba. Grupo tratado con MLT (RT-MLT n=6); animales que fueron expuestos al protocolo de radiación, los cuales recibieron pre-tratamiento con 50 mg/Kg de MLT¹⁸ vía i.p. 30 minutos antes y después de la sesión de radioterapia.

Protocolo de radiación:

Los animales fueron anestesiados con 10% de ketamina y 2% de xilacina en una proporción 50/5 mg/kg por vía i.p. Para el procedimiento de radiación, se empleó una como irradiador bomba de Cobalto-60 (Servicio de Radioterapia y Medicina Nuclear del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM); marca INVAP, modelo TERADI-80), ya que permite planificar la irradiación de forma más sencilla y eficaz, que consistió en una única dosis de 50 Gy¹⁸, administrada a una tasa de 1.66 Gy/min, para un tiempo de exposición aproximado de 30 minutos, ya que de esta manera se garantiza una sesión exitosa acorde al tiempo de duración de la anestesia. Los animales fueron ubicados en el

Ciencia Odontológica

Vol. 15 N° 1 (Enero-Julio 2018), pp. 20-21

borde de un campo de radiación de tamaño 30x30 cm², exponiendo sólo la mandíbula inferior de cada uno⁵, aislando la mandíbula superior con bloques de plomo y el resto del cuerpo quedó fuera del campo de radiación.

Tratamiento con melatonina:

Los animales pertenecientes al grupo RT-MLT, recibieron 50 mg/kg de melatonina (Sigma; EEUU)¹⁸ 30 minutos antes y después de la sesión de radioterapia.

Evaluación clínica:

Como parte de la evaluación, se tomó el peso corporal de los animales antes de realizar la valoración clínica en las 1½, 3 y 6 semanas post-radiación, para lo cual los animales fueron anestesiados con 10% de ketamina y 2% de xilacina en una proporción 50/5 mg/kg por vía i.p. Una vez anestesiados, se examinó toda la mucosa bucal de los animales con ayuda de una espátula, buscando signos evidentes de lesiones asociadas a mucositis, xerostomía así como la alopecia o pérdida de cabello. La xerostomía se determinó utilizando la variable presente/ausente, mientras que la severidad de la mucositis se evaluó tomando en cuenta la escala propuesta por Parkins y col.¹⁹ (Tabla 1). El grado de alopecia se expresó mediante la siguiente escala cualitativa: 0= ausencia; 1= alopecia parcial; 2= alopecia total.

Análisis estadístico:

Para determinar la variación del peso corporal de los animales, se utilizó un análisis de ANOVA de dos vías. Los resultados fueron expresados como promedio \pm desviación estándar, mientras que para el análisis de los datos clínicos, se realizó un análisis de estadística descriptiva, expresando los resultados en porcentajes, así como se realizó la prueba de Mann Whitney para establecer diferencias entre los grupos estudiados. Se estimó el coeficiente de correlación de Spearman para establecer si existía asociación entre las variables clínicas peso, mucositis y xerostomía.

Tabla 1. Escala de grados de mucositis en animales.

ESCALA MUCOSITIS	
0	Normal
0.5	Ligeramente rosada
1	Ligeramente roja
2	Severamente roja
3	Descamación focal
4	Exudación en menos de la mitad de la mucosa
5	Ulceración completa de la mucosa

Fuente: Parkins et al. 1983

Se consideró un valor de significancia estadística un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS:

Variación del peso:

El peso de los animales irradiados disminuyó en la primera semana y media, luego de la radiación, los animales recuperaron su peso corporal a medida que avanzaron los días, superando el peso inicial a la 6ta semana postradiación. El peso inicial de los animales pertenecientes al grupo RT-PBS fue de 335 \pm 17 gr., el cual disminuyó en un 8,7 % a la semana y media después de la sesión de radioterapia y fue aumentando progresivamente, hasta representar un aumento del 2,6 % con respecto al peso inicial. Por otro lado, el peso inicial del grupo RT-MLT fue de 335 \pm 20, el cual disminuyó en la primera semana en un 11 % y luego se fue incrementando hasta aumentar un 3,2 % con respecto al peso inicial. El grupo PBS (sin irradiación) inicio el protocolo de experimentación con un peso de 304 \pm 21 gr, el cual fue subiendo a medida que avanzó el ensayo hasta alcanzar un aumento del 5,4% con respecto al peso inicial (Figura 1). Hubo una interacción estadísticamente significativa ($p = 0,0009$) entre el tratamiento (radiación) y peso del animal, sugiriendo que la pérdida de peso durante la primera semana después de la radiación fue diferente en cada grupo ($p < 0,0001$); específicamente esta tuvo

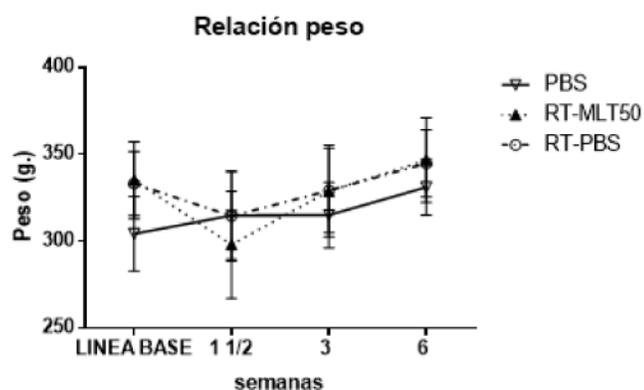


Figura 1. Representación gráfica del peso en gramos de ratas Sprague Dawley sometidas a una sesión única de radiación ionizante. Valores expresados como promedio \pm desviación estándar del peso antes de la radiación, al inicio, semana y media, 3 semanas y 6 semanas después de la radiación. Interacción significativa entre las semanas de evaluación con respecto a los grupos experimentales (ANOVA de 2 vías; F 3,42; p= 0,0009). Resultados obtenidos de al menos 5 animales.

una tendencia a ser mayor en los animales que no recibieron tratamiento con MLT.

Características clínicas:

En los tiempos en los que fueron evaluados los animales, no se observaron fracturas, ni pérdida de crecimiento en los dientes incisivos. Sin embargo, un animal del grupo RT-PBS murió en la primera semana después de la radiación. Así mismo, todos los animales que fueron irradiados presentaron unos de los signos más frecuentes que se evidencian en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello que son sometidos a radiación, como lo son mucositis y xerostomía, dichos animales también presentaron alopecia en la zona irradiada (Figura 2). La mucositis se midió en una escala ordinal desde ausente (grado cero) hasta ulceración completa de la mucosa oral (grado cinco). En la primera semana y media de evaluación postradiación, el 60 % de los animales irradiados controles (grupo RT-PBS) exhibieron entre grado 1 y 3 de mucositis mientras que el otro 40%



Figura 2. Fotografías de ratas Sprague Dawley luego de irradiación de la región mandibular y simulación de la misma. La última fila muestra la mucosa oral normal de una animal control tratado con PBS y sin irradiación. En las filas superiores, se observa la presencia de pseudomembranas blanquecinas (flechas) en ambos grupos irradiados tratados con melatonina o PBS (RT-MLT y RT-PBS), y la disminución de las mismas en la tercera semana postradiación hasta la total desaparición al final del protocolo (sexta semana). Del mismo modo, se observa la aparición de alopecia (asteriscos) a lo largo del protocolo de experimentación. Nótese que en los animales irradiados tratados con MLT, la alopecia aparece forma retardada (a las 3 semanas) respecto aquellos tratados con PBS, en quienes aparece a la semana y media.

presentó un grado 4; la tercera semana, los signos de mucositis disminuyeron y para la sexta semana no se observaron en ninguno de los animales. Un comportamiento similar, tuvo el grupo RT-MLT para

Ciencia Odontológica

Vol. 15 N° 1 (Enero-Julio 2018), pp. 22-23

la primera semana de evaluación, donde el 50 % de los animales presentaron entre grado 1 y 3 de mucositis mientras que el otro 50% presentó grado 4 y 5; para la tercera semana, al igual que el grupo control, los grados de mucositis disminuyeron, estando ausentes por completo a la sexta semana postradiación. El grupo no irradiado no presentó mucositis en ninguno de los días de evaluación (figura 3 A). Se evidenció una correlación negativa significativa ($r = -0,7158$; $p = 0,0115$; $N = 12$) entre el peso de los animales

pertenecientes a los grupos irradiados (RT-PBS + RT-MLT) con respecto al grado de mucositis, lo que indica que cuando el grado de mucositis es mayor, el peso de los animales disminuye (figura 4).

En cuanto a la xerostomía, la misma estuvo presente en el 40% de los animales pertenecientes al grupo RT-PBS en la primera semana postradiación, mientras que en el grupo RT-MLT, se observó la presencia de la misma en un 50% de los animales. En el transcurrir de la evaluación, el porcentaje de los

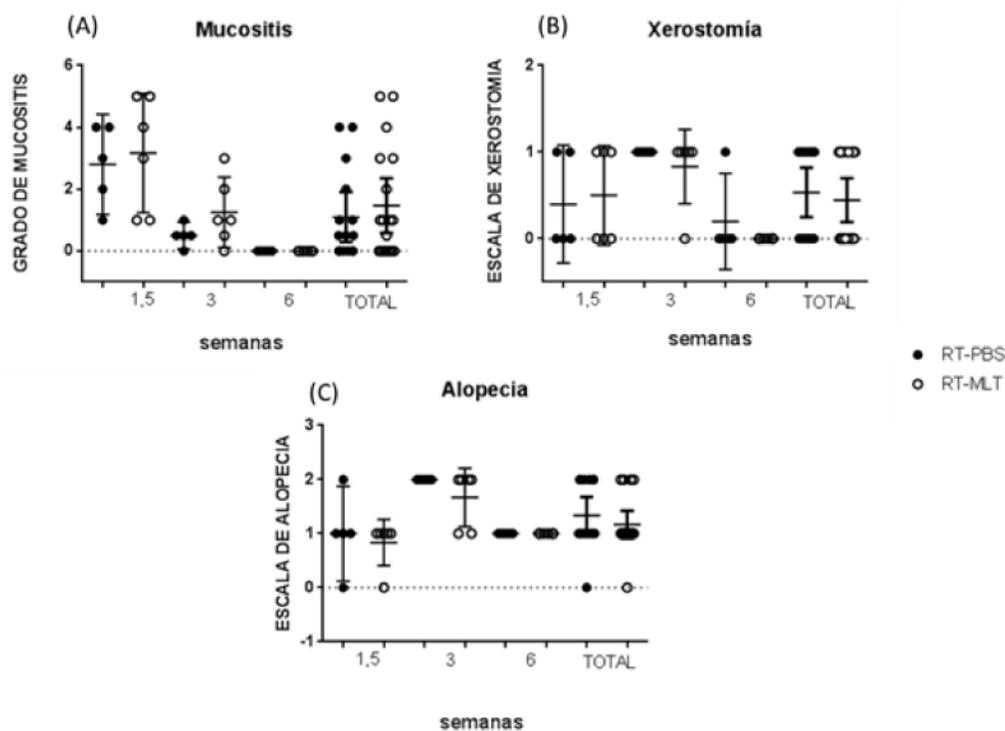


Figura 3. Representación gráfica del efecto de la melatonina ($n = 6$) sobre la región orofacial de animales irradiados ($n = 5$). La gráfica A muestra el número de animales que presentó mucositis en grados del 0 al 5 (eje de las Y) semana y media postradiación, hasta el final del protocolo (eje de las X); al final de la gráfica se muestra el comportamiento global de cada grupo (TOTAL). No se observaron diferencias significativas al comparar los grupos irradiados ($p = 0,6101$). La gráfica B muestra el número de animales irradiados que presentaron o no xerostomía (eje de las Y) luego de la radiación y a lo largo de la evaluación (eje de las X); al final de la gráfica se muestra el comportamiento global de los grupos irradiados, que aun cuando no hubo diferencias significativas ($p = 0,7319$) se observa una tendencia hacia la prevención de la xerostomía por parte de la melatonina. La gráfica C muestra el número de animales con alopecia parcial, total, o ausencia de la misma (eje de las Y) luego de la sesión de radioterapia y a lo largo de la evaluación (eje de las X); al final de la gráfica se muestra el comportamiento global de los animales irradiados, donde no se observaron diferencias significativas ($p = 0,4038$), sin embargo se observa que la melatonina tiende a prevenir el desarrollo de alopecia de los animales irradiados. MannWhitney test con un valor de significancia de $p = 0,05$.

animales con xerostomía en el grupo sin tratamiento aumento al 100%, mientras que en el grupo tratado con melatonina solo estuvo presente en el 83,3% de los animales. Para el final del protocolo, la xerostomía en el grupo RT-PBS disminuyó al 20%, mientras que en el grupo RT-MLT, ninguno evidenció signos de xerostomía. El grupo control (sin irradiación) no presentó xerostomía en ninguno de los días de la evaluación (figura 3 B). No hubo correlación significativa al comparar la presencia/ausencia de xerostomía con el peso de los animales de ambos grupos irradiados en la primera semana y media postradiación.

Hubo alopecia parcial y total en el 60% y 40% respectivamente, de los animales del grupo control RT-PBS. Por su parte, en el grupo RT-MLT, la alopecia estuvo presente de forma parcial en el 83,7% mientras que el 16,7% de los animales no tuvo signos de alopecia en la primera semana. Para la tercera semana el 100% de los animales controles RT-PBS presentó alopecia total mientras que sólo el 66,7% de los animales del grupo RT-MLT presentaron alopecia total y el 33,3% evidenciaron alopecia parcial. Finalmente, a las 6 semanas postradiación, el 100% de los animales pertenecientes a los 2 grupos experimentales evidenciaron alopecia parcial. El grupo PBS, no presentó signos de alopecia en ninguno de los días de evaluación (figura 3 C).

Discusión

Los resultados de este trabajo, demuestran que el peso corporal los animales irradiados disminuyó la primera semana postradiación, debido a la presencia de mucositis, sin embargo, hubo recuperación del peso de forma progresiva, hasta sobrepasar el peso inicial al final del protocolo experimental. De igual manera, dichos animales presentaron signos clínicos de mucositis a diferentes grados, xerostomía y alopecia, los cuales se evidenciaron de forma más marcada en las primeras semanas de evaluación y disminución de las mismas al final del ensayo, observándose una

tendencia de prevención tanto de xerostomía, como de alopecia en los animales tratados con melatonina.

En este sentido, cuando los pacientes con cáncer de cabeza y cuello son sometidos a radioterapia, pueden desarrollar diversas afecciones, siendo las principales mucositis y xerostomía²⁰. Dichas afecciones causan en estos pacientes molestias que afectan su calidad de vida, como por ejemplo dificultad de ingesta, masticación y deglución de los alimentos, trayendo como consecuencia pérdida de peso²¹. En este estudio, se evidenció que en los animales irradiados disminuyó el peso corporal en las primeras semanas posteriores a la radiación, lo que se interrelaciona con la severidad de los signos de mucositis que desarrollaron los animales, sugiriendo que el desarrollo de estas manifestaciones afectó indudablemente su capacidad de ingesta de alimentos, generando pérdida de peso, el cual se fue recuperando a medida que avanzó el tiempo del protocolo experimental y por la disminución concomitante de la mucositis, logrando una compensación positiva del peso corporal. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en ratas sometidas a braquiterapia, donde los animales presentaron una pérdida significativa de peso en comparación con el grupo no irradiado los primeros días posteriores a la radiación y que se recuperó a lo largo del experimento²².

Tal como se observa en los pacientes que reciben radiación en la región oro-facial, los animales utilizados en este trabajo desarrollaron características clínicas como mucositis, alopecia y xerostomía, las cuales se revirtieron en su severidad al final del protocolo, esto se puede explicar por el hecho de que algunos tejidos son más radiorresistentes que otros a la exposición de la radiación²³, recuperándose más rápido y a menores dosis: por ejemplo, las células del tejido sano tienen una mejor capacidad de recuperación post-radiación que las células tumorales; en este sentido, los animales de este estudio, al ser sometidos a una dosis única de radiación, el tejido de la región mandibular tiene la capacidad de reparar el daño causado por la radiación y recuperarse del

Referencias

1. Thomson PJ, Greenwood M, Meechan JG. General medicine and surgery for dental practitioners. Part 6–Cancer, radiotherapy and chemotherapy. *Br Dent J*. 2010. 209: 65–8.
2. Chia-Ming Yeh, Shih-Chi Su, Chiao-Wen Lin, Wei-En Yang, Ming-Hsien Chien, Russel J. Reiter et al. Melatonin as a potential inhibitory agent in head and neck cancer. *Oncotarget*, 2017. Vol. 8, (No. 52), pp: 90545-90556
3. Marsh Robert de W, Samuel J. *Essentials of clinical oncology*. 1st ed USA: The McGraw-Hill Medical. 2007: 578-83.
4. Ballas L, Elkin E, Schrag D, Minsky B, y Bach P. Radiation therapy facilities in the United States. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2006. 66 (4): 1204–1211.
5. Cakmak I, Simsek G, Yildiz A, Vardi N, Polat A, Tanbek K, Gurocak S, Parlakpınar H. Melatonin's protective effect on the salivary gland against ionized radiation damage in rats. *J Oral Pathol Med*. 2016. doi: 10.1111/jop.12386
6. Tolentino Ede S, Centurion BS, Ferreira LH, Souza AP, Damante JH, Rubira-Bullen IR.. Oral adverse effects of head and neck radiotherapy: Literature review and suggestion of a clinical oral care guideline for irradiated patients. *J Appl Oral Sci*. 2011.19: 448–54.
7. Albuquerque DF, de Souza Tolentino E, Amado FM, Arakawa C, Chinellato LE. Evaluation of halitosis and sialometry in patients submitted to head and neck radiotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15: e850–4.
8. Mhatre MC, Van Jaarsveld AS, Reiter RJ. Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation. *Biochem Biophys Res Comm*. 1980; 153: 1186–92.
9. Bubenik GA, Brown GM, Grota LJ. _Immunohistochemical localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia*. 1977; 33: 662–3.
10. Reiter RJ, Richardson BA, Matthews SA. Rhythms in immunoreactive melatonin in the retina and handerian gland of rats. *Life Sci*. 1983; 32: 1129–36.
11. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 113–32.
12. Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev*. 2002; 123: 1007–19.
13. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 527: 539–48.
14. Rivara S, Pala D, Bedini A. Therapeutic uses of melatonin and melatonin derivatives: a patent review (2012–2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015; 12: 1–17.
15. Tan DX, Chen LD, Poeggeler BLC. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J*. 1993; 1: 57–60.
16. Onseong K, Johns N, Khuayjarernpanishk T, Subongkot S, Priprem A, Hurst C, Johns J. Beneficial Effects of Adjuvant Melatonin in Minimizing Oral Mucositis Complications in Head and Neck Cancer Patients Receiving Concurrent Chemoradiation. *The journal of alternative and complementary medicine*. 2017 Volume 00, Number 00. pp. 1–7
17. Mihandoost E, Shirazi A, Mahdavi Sr et al. Can melatonin help us in radiation oncology treatments? *Biomed Res Int* 2014; 2014:578137.
18. Çakır Z, Demirel C, Cagiran C, Kilciksiz, Gürgül S. Zincircioğlu B, Erdal N. Melatonin can Ameliorate Radiation-Induced Oxidative Stress and Inflammation-Related Deterioration of Bone Quality in Rat Femur. *Inflammation*. 2016. DOI: 10.1007/s10753-016-0347-x
19. Parkins CS, Fowler JF, Yu S. A murine model of lip epidermal/ mucosal reactions to X-irradiation. *Radiother Oncol*. 1983; 1:159-165.
20. Bascones-Martínez A, Muñoz-Corcuera M y Gómez-Font R. Efectos secundarios bucales de la radioterapia y quimioterapia en el cáncer en la región cervicofacial. *Med Clin (Barc)*. 2013; 141(2):77–81
21. Escoda-Francoli J, Rodríguez-Rodríguez A, Pérez-García S, Gargallo-Albiol J Gay-Escoda C. Dental implications in oral

cancer patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16: e508–13.

22. Cohen M, Nishimura I, Tamplen M, Hokugo A, Beumer J, Steinberg M, Suh J, Abemayor E, Nabili V. Animal model of radiogenic bone damage to study mandibular osteoradionecrosis. *American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery* 32 2011; 291–300.

23. Pavlopoulou A, Bagos P, Koutsandrea V, Georgakilas A. Molecular determinants of radiosensitivity in normal and tumor tissue: A bioinformatic approach. *Cancer Letters*. 2017, doi: 10.1016/j.canlet.2017.05.023.

24. Najafi A, Shirazi E, Motevaseli A, H. Rezaeyan A, Salajegheh S, Rezapoor. Melatonin as an anti-inflammatory agent in radiotherapy. *Inflammopharmacology*. 2017 Aug; 25 (4):403-413.

25. Permuy M, López-Peña M, González-Cantalapiedra A, Muñoz F. Melatonin: A Review of Its Potential Functions and Effects on Dental Diseases. Reiter R, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(4):865. doi:10.3390/ijms18040865.

26. Moneim A, Guerra-Librero A, Florido J, Ying-Qiang S, Fernández-Gil B, Acuña-Castroviejo D, Escames G. Oral Mucositis: Melatonin Gel an Effective New Treatment. *Int. J. Mol. Sci*. 2017, 18, 1003; doi:10.3390/ijms18051003

27. Sonis S. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:277–284.

28. Ortiz F, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, Dayoub J, Lopez L, Venegas C, et al. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. *J. Pineal Res*. 2015 Jan; 58(1):34-49.

29. Cevik-Aras H, Godoy T, Ekstrom J. melatonin-induced protein synthesis in the rat parotid gland. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2011, 62, 1, 95-99

30. Bléry P, Espitalier F, Hays A, Crauste E, Demarquay C, Pilet P, et al. “Development of mandibular osteoradionecrosis in rats: Importance of dental extraction”. *J CraniomaxillofacSurg*; 2015; 43(9):1829-36

31. Tamplen M, Trapp K, Nishimura I, Armin B, Steinberg M, Beumer J, et al. Standardized Analysis of Mandibular Osteoradionecrosis in a Rat Model. *Otolaryngology– Head and Neck Surgery*. 2011; 145(3) 404–410

32. Fenner M, Park J, Schulz N, Amann K, Grabenbauer G, Fahrig A, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2010; 38, 47e53.

33. Kobayashi H, Kromminga A, Dunlop TW, Tychsens B, Conrad F, Suzuki N, et al. A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *FASEB J* 2005;19:1710e2

34. Slominski A, Hardeland R, Zmijewski M4, Slominski R, Reiter R, Paus R. Melatonin: A Cutaneous Perspective on its Production, Metabolism, and Functions. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018. doi:10.1016/j.jid.2017.10.025

35. Denayer T, Stöhr T, Van Roy M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*. 2014; 2: 5–11