

Camila de Carvalho Almança Lopes

**Efeito da radioterapia e do flúor na perda mineral,
nas propriedades mecânicas e na morfologia do
esmalte submetido a ciclagem de pH in vitro**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção do Título
de Mestre em Clínica Odontológica.

Uberlândia, 2016

Camila de Carvalho Almança Lopes

Efeito da radioterapia associada ou não ao fluoreto na perda mineral, nas propriedades mecânicas e na morfologia do esmalte quando submetidos a ciclagem de pH in vitro

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana Resende Novais Simamoto

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Veridiana Resende Novais Simamoto

Prof. Dr. Murilo de Sousa Menezes

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

Uberlândia, 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- L864e
2016
- Lopes, Camila de Carvalho Almança, 1991
Efeito da radioterapia associada ou não ao fluoreto na perda mineral, nas propriedades mecânicas e na morfologia do esmalte quando submetidos a ciclagem de pH in vitro / Camila de Carvalho Almança Lopes. - 2016.
57 p. : il.
- Orientadora: Veridiana Resende Novais Simamoto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Inclui bibliografia.
1. Odontologia - Teses. 2. Esmalte dentário - Teses. 3. Radioterapia - Teses. 4. Fluor - Teses. I. Simamoto, Veridiana Resende Novais. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 289 – COPOD

Data: 19/02/2016

Discente: Camila de Carvalho Almança Lopes, Matrícula: 11412ODO001

Título do Trabalho: Efeito da radioterapia e do flúor na perda mineral, nas propriedades mecânicas e na morfologia do esmalte submetido a ciclagem de pH in vitro.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Propriedades Físicas e Biológicas dos materiais odontológicos e das estruturas dentais.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Propriedades Físicas e Biológicas dos materiais odontológicos e das estruturas dentais.

- As oito horas do dia **dezenove de fevereiro do ano de 2016** no Anfiteatro Bloco 4L, Anexo A, Sala 23, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro 2016, assim composta: Professores Doutores: Murilo de Sousa Menezes (UFU); Marina Guimarães Roscoe (UNG); e Veridiana Resende Novais

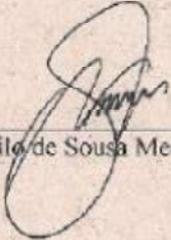
Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dra. Veridiana Resende Novais Simamoto apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

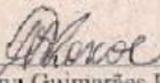
A seguir o senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadore (a)s, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimeada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

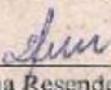
- Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato(a) OU provado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11 horas e 10 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Murilo de Sousa Menezes – UFU


Profa. Dra. Marina Guimarães Roscoe – UNG


Profa. Dra. Veridiana Resende Novais Simamoto – UFU
Orientador (a)



DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais Mara e Ronan,
as minhas irmãs Isabela e Gabriela e
ao meu namorado Pedro Henrique, vocês me
completam e dão sentido a minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora Dra. Veridiana Resende Novais Simamoto, por depositar em mim a confiança para trabalharmos juntas desde a minha graduação. Pela paciência, cuidado, carinho e disposição com os quais você sempre conduz seus trabalhos. Obrigada por me fazer buscar o conhecimento e acreditar em mim. Acima de tudo obrigada pelo acolhimento em sua casa e por me permitir ser além de ser sua orientada, sua amiga. À você meu respeito e admiração!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, por me presentear com cada amanhecer. Obrigada por me dar sabedoria, paciência e força e por me guiar até aqui.

Aos **meus pais, Ronan e Mara**, agradeço pelo amor incondicional, por todos os ensinamentos, pelo seu caráter, sua verdade, respeito, companheirismo, compreensão, cumplicidade, força e por não me deixar esquecer que Deus tem um propósito para a nossa vida. Agradeço sobremaneira por acreditarem nos meus sonhos, me incentivarem e não medir esforços para realizá-los. Esta conquista também é de vocês! Serei eternamente grata por sempre fazerem questão de estarem perto, unidos, participando da minha vida e pelo esforço que fazem diariamente para proporcionar o melhor para as suas filhas. Vocês são o meu equilíbrio. Amo vocês!

Às **minhas irmãs, Isabela e Gabriela**, que mais do que irmãs, são minhas melhores amigas! Obrigada pelo companheirismo, cumplicidade e amizade em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo carinho, cuidado, apoio, paciência e compreensão. Dividir com vocês cada momento dessa trajetória tornou-a mais leve e prazerosa. Amo muito vocês!

Ao **meu namorado, Pedro Henrique**, pelo amor, companheirismo, incentivo, força, paciência e cuidado! Obrigada por me trazer paz... por torcer pelo meu sucesso. Você foi nesta fase um grande exemplo de força, perseverança e dedicação. Você é muito importante para mim! Te amo muito!

À **toda minha família**, em especial a minhas **avós Meire e Olivertina** pelo amor, pelas orações e torcida constantes. Amo vocês!

À **Natália Carvalho e Carine Schumacher** pela amizade de tantos anos, por sempre me acompanharem mesmo que a distância e torcerem pelo meu crescimento. Obrigada pela partilha de tantos bons momentos vividos juntas, por serem tão especiais. Sinto-me privilegiada em tê-las como amigas. E obrigada por me darem dois grandes amigos, **Leopoldo e William**.

À **Eliane, Pedro, João Pedro, Roseni, Eder e Lorraine** pelo convívio, amizade, por me acolherem tão bem na família de vocês. Obrigada pelos momentos compartilhados, pelas conversas e por sempre se preocuparem comigo.

Aos meus queridos amigos **Alessandra, Rodrigo, Mário, Renato, Diego, Poliana, Bernardo** por me acolherem, pelo companheirismo e por todos os bons momentos.

Aos amigos e pós graduandos orientados da Prof^a. Veridiana, **Renata Borges, Fernanda Castelo e Rafael Resende**, pela amizade e companheirismo! Foi muito bom poder trabalhar com vocês. Obrigada por serem tão importantes nesta jornada!

Aos amigos e alunos de iniciação científica da Profa. Veridiana, **Caroline Maluf, Renata Vargas, Letícia Lopes e Felipe Graça** pela amizade, trocas de conhecimento indispensáveis para o crescimento de uma equipe e auxílios no laboratório para a execução deste trabalho. Obrigada Carol e Renatinha por me permitirem realizar a co-orientação de vocês, levarei boas recordações e muito aprendizado.

Aos **amigos do mestrado**, agradeço pela convivência, amizade, conhecimentos compartilhados e por tornar mais fácil e agradável essa etapa. Desejo a cada um de vocês um caminho de muitas realizações e sucesso!

Ao **Prof. Vitor Carvalho Lara** e aos físicos **Francisco Américo Silveira Marcelino e Adriano Luiz Balthazar Bianchini** do setor de Radioterapia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, Uberaba-MG, pela ajuda e cuidado com o meu trabalho.

Ao **Prof. Victor Elias Arana-Chavez**, pela disponibilidade, por me receber tão bem em São Paulo, pela realização da microscopia eletrônica de varredura e pela amizade.

Aos professores da banca de qualificação, **Prof. Carlos José Soares, Prof. Luis Raposo, Prof. Paula Dechichi**, muito obrigada pelas considerações e contribuições que fizeram para o meu trabalho. Obrigada pelo aprendizado e pela amizade.

À **Priscila Soares**, pela amizade e pelo cuidado durante a realização do ensaio de microdureza. Obrigada pela paciência, conversas e aprendizado.

Ao **Laboratório de Tecnologia em Atrito e Desgaste (LTAD) da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia**, na pessoa do **Prof. Sinésio Domingues**, por permitir a realização do teste de microindentação.

Aos **técnicos do Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular (CPBio), Jonh Douglas e Eliete**, obrigada por cada bom-dia ao chegar no laboratório, pela amizade e ajuda!

À **Ester e Mariani**, técnicas do laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela disposição e cuidado que tiveram com o meu trabalho! Obrigada pela alegria e dedicação com que vocês realizam seus trabalhos! À Mari, pela amizade e por todo esforço em fazer com que as microscopias dessem certo e toda a paciência durante as nossas tentativas.

Aos **professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU)** pela dedicação, amizade e ensinamentos transmitidos a mim na graduação e pós-graduação. Vocês são espelhos para mim!

Aos **funcionários da FOUFU**, em especial à Daniela, Wilton, Camila, Daniele, Graça, Brenda, Lindomar, Doralice e Advaldo. Muito obrigada pela amizade e ajuda sempre que precisei.

Às colegas da especialização, **Emmelyne, Rafaela, Bruna, Mália, Jéssica, Camila**, pelos bons momentos vividos juntos e pela amizade de todas.

À **Universidade Federal de Uberlândia e Faculdade de Odontologia – FOUFU**, obrigada pela oportunidade de cursar uma pós-graduação stricto sensu.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro por meio da bolsa de mestrado. **À FAPEMIG**, pelo apoio financeiro.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

À todos que torceram por mim e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1- INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2- PROPOSIÇÃO.....	20
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4- RESULTADOS.....	34
5- DISCUSSÃO.....	38
6- CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO.....	52

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da radioterapia, associada ou não a aplicação tópica de flúor gel neutro, na composição química, nas propriedades mecânicas e na morfologia do esmalte após ciclagem de pH *in vitro*. Trinta terceiros molares foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=10): Esmalte não irradiado (NI); Irradiado em umidade relativa (IU); e Irradiado em flúor gel neutro (IF). Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos (n=5) de acordo com a presença de ciclagem de pH: com e sem ciclagem. Os dentes dos grupos IU e IF foram submetidos a um protocolo de irradiação de 2Gy diários, cinco dias por semana, durante sete semanas, totalizando 70 Grays (Gys). Alterações químicas foram quantificadas por meio de Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR). Os parâmetros avaliados foram: razão matriz:mineral (M:M), conteúdo relativo de carbono (CRC) e cristalinidade. Também foi realizada avaliação da microdureza (VHN) e do módulo de elasticidade (*E*) do esmalte em três profundidades (superficial, médio e profundo). A morfologia do esmalte foi avaliada por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) (n=3). M:M, CRC e cristalinidade foram analisados por meio de ANOVA em dois fatores e os dados de VHN e *E* foram analisados por meio de ANOVA em três fatores seguido pelo teste HSD de Tukey ($\alpha < 0,05$). IF sem a ciclagem de pH obteve os menores valores de razão M:M. IU apresentou os maiores valores de *E*, seguidos de IF e NI. A ciclagem de pH promoveu redução na CRC e aumento da cristalinidade do NI e IF; e também aumentou VHN e *E* para NI e IF. Após a ciclagem de pH, NI apresentou os menores valores de *E*. As imagens do MEV não mostraram nenhuma alteração morfológica nos grupos sem ciclagem de pH. Já com a ciclagem de pH, NI apresentou a maior descontinuidade da morfologia externa do esmalte. Conclui-se que a radioterapia altera o módulo de elasticidade do esmalte. A ciclagem de pH aumenta a cristalinidade e o conteúdo de fosfato do esmalte e também aumenta as propriedades mecânicas. No entanto, diminui o conteúdo de carbonato. O fluoreto associado a radioterapia reduz a exposição da matriz orgânica e ajuda a manter a morfologia externa do esmalte irradiado.

Palavras chave: Desmineralização do dente; Esmalte dental; Flúor; Radioterapia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of radiotherapy, associated or not with fluoride topical application, on chemical composition, mechanical properties and morphology of enamel demineralization in vitro. Thirty third molars were randomly divided into three groups (n=10): Non-irradiated enamel (NI); Irradiated enamel in relative humidity (IH), Irradiated enamel in neutral sodium fluoride gel (IF). Each group was also subdivided into two subgroups accordingly to the presence of pH cycling: with or without pH cycling. The teeth of the IH and IF groups were submitted to a radiation protocol of 2 Gy daily, five days per week, per seven weeks, totalizing 70 Gy. Chemical composition changes were measured by Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR). The analyzed parameters were: matrix:mineral ratio (M:M), relative carbon content (RCC) and crystallinity. It was also evaluated the Vickers Microhardness (VHN) and Elastic Modulus (*E*) at three depths (superficial, middle and deep), Enamel morphology was assessed by scanning electron microscopy (SEM) (n=3). M:M, CRC and crystallinity were analyzed using 2-Way ANOVA and VHN and *E* data using 3-Way ANOVA, followed by Tukey HSD test ($p < 0.05$). IF without pH cycling had the lowest values of M:M ratio. IH presented the higher *E* values, followed by IF and NI. The pH cycling promoted reduction in RCC; and increased crystallinity of NI and IF and also increased VHN and *E* for NI and IF. With the pH cycling, NI showed the lowest *E* values. SEM images showed no morphological alterations for all groups without pH cycling. With pH cycling, NI showed the greatest discontinuity of the enamel outer morphology. It was concluded that radiotherapy alters the elastic modulus of the enamel. The crystallinity and the phosphate content of the enamel increase after pH cycling, and also increase its mechanical properties. However, diminish the relative carbonate content. The fluoride reduce the organic matrix and maintain the outer morphology of the irradiated enamel.

Keywords: Dental Enamel; Fluoride; Tooth Demineralization; Radiotherapy.

1 - INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, “câncer” é um termo dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos, com possibilidade de ocasionar metástase para outras regiões do corpo (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA). O câncer de cabeça e pescoço (cavidade oral, faringe e laringe) tem sido reconhecido como um dos cânceres com mais alta taxa de prevalência (Jemal et al., 2008); é responsável por uma incidência de 900.000 casos novos por ano no mundo (Silveira et al., 2012), sendo a sexta causa de morte por câncer em todo o mundo (Ruiz et al., 2006). Especificamente os tumores malignos da cavidade oral são constituídos pelo carcinoma epidermóide. Outros cânceres podem ser citados, embora apresentem menor incidência, tais como: os tumores salivares (das glândulas salivares menores e sublingual), os sarcomas (os de origem vascular, os musculares e os ósseos) e o melanoma de mucosa (INCA). No Brasil em 2016, estima-se 15.490 casos novos de câncer da cavidade oral, sendo 11.140 homens e 4.350 mulheres (INCA, Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa/2016).

Diferentes métodos para tratamento de câncer de cabeça e pescoço estão disponíveis, como: cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação destes tratamentos (Beumer, Curtis e Marunick, 1996). A radioterapia consiste em dirigir uma dose correta de radiação ionizante para a massa tumoral, tentando minimizar a dose recebida por áreas fora da zona do tumor (Nectarios e Chris, 2001). Essa radiação ionizante carrega energia e, ao interagir com os tecidos, dá origem a elétrons rápidos que ionizam o meio e criam efeitos químicos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA na tentativa de destruir as células tumorais (Novelline, 1999). Várias fontes de energia podem ser utilizadas para o processo da radioterapia: existem aparelhos que utilizam energia elétrica para liberar raios X e elétrons e outros que utilizam fonte de isótopo radioativo, como por exemplo, pastilhas de cobalto as quais geram raios gama (INCA). A maioria dos oncologistas trata seus pacientes com o “fracionamento ideal”. Este tratamento consiste de uma dose total de 65 a 72 Gray (Gy) de radiação de alta energia de raios-x em frações diárias de 1,8 a 2

Gy durante um período de sete semanas, cinco dias por semana (Jham e da AR, 2006; Kielbassa et al., 2006; Nutting et al., 2011; Seikaly et al., 2004; Beumer, Curtis e Marunick, 1996).

Apesar da vantagem de preservar a estrutura do tecido, a radioterapia causa mudanças adversas na cavidade oral (Specht, 2002; Kielbassa et al., 2006). Muitos tecidos orofaciais são afetados, sendo alguns dos mais importantes as glândulas salivares, dentes, membranas mucosas, ossos e papilas gustativas (Andrews e Griffiths, 2001). A intensidade destas reações irá depender do volume, do local irradiado, da dose total, do fracionamento da dose, da idade, das condições clínicas do paciente e dos tratamentos associados (Cacelli & Raport, 2008). A maior parte das consequências são temporárias, como a perda do paladar, tecidos moles sensíveis ou dolorosos, infecções por fungos e mucosite (Anneroth, Holm e Karlsson, 1985; Jham e da AR, 2006; Kielbassa et al., 2006; Beumer, Curtis e Marunick, 1996). Outras consequências têm um caráter mais permanente como atrofiação de músculos na região da mandíbula, trismo, mudanças da microbiota oral e de proteínas, hipossalivação, xerostomia e osteorradionecrose da mandíbula (Jham e da AR, 2006; Kielbassa et al., 2006; Beumer, Curtis e Marunick, 1996).

Por último e não menos importante, ocorrem as alterações na estrutura dentária. A gravidade e a extensão dos efeitos da radiação dependem do conteúdo mineral e orgânico das estruturas do dente. A porção mineralizada é suscetível a danos em sua fase cristalina (Aoba et al., 1981; Pioch et al., 1991; Kielbassa et al., 1999), tendo as propriedades mecânicas alteradas (Kielbassa et al., 1999), assim como sua resistência ao desgaste (Jervøe, 1970) e redução da resistência ao ataque ácido (Kielbassa et al., 1999). Alterações físicas e químicas do esmalte como resultado direto da radioterapia foram documentadas (Aoba et al., 1981; Geoffroy e Tochan-Danguy, 1985; Jervøe, 1970; Shulin, 1989). Pouco tempo após a radioterapia, o esmalte mostra extensa destruição da estrutura prismática (Grötz et al., 1998). Esta desmineralização do esmalte irradiado apresenta um padrão diferente em relação ao esmalte não irradiado (Grötz et al., 1998; Jansma et al., 1993). O esmalte irradiado mostra-se mais

vulnerável a ataques de ácido do que o esmalte saudável (Grötz et al., 1998, Kielbassa et al., 1999; Kielbassa et al., 2002). A profundidade de desmineralização e solubilidade do esmalte é controverso, visto que alguns estudos têm demonstrado nenhuma diferença entre esmalte irradiado e não irradiado (Wen, 1989; Shannon et al., 1978), enquanto outros estudos descrevem uma maior solubilidade após radioterapia (Jansma et al., 1993; Joyston-Bechal, 1985), ou até mesmo um ligeiro decréscimo na solubilidade (Pioch et al., 1991).

Quanto as alterações das propriedades mecânicas, observa-se uma redução da resistência à tração devido a alterações no componente da proteína deste substrato (Soares et al., 2010). Alterações importantes da radioterapia em dentina são devidas a danos das fibrilas de colágeno (Cheung et al., 1990), resultando em uma alteração significativa da dureza (Kielbassa et al., 1999), da resistência ao desgaste, da tração e da estabilidade da junção amelo-dentinária (Pioch, Golfels, Staehle, 1992).

Dentro de três meses após a radioterapia na região da cabeça e pescoço os primeiros sinais de deterioração do tecido duro dos dentes podem ser vistos (Vissink et al., 2003; Wöstmann e Rasche, 1995). Esses sinais são áreas de porosidade do esmalte, formação de cavitações com a exposição do esmalte subsuperficial, ou até mesmo da dentina subjacente. À esta deterioração atípica dá-se o nome de cárie de irradiação, sendo uma de suas características a progressão rápida e na maior parte sem dor (Jansma et al., 1993; Walker et al., 2001; Kielbassa et al., 2006). A evolução dessa alteração está relacionada a diminuição do fluxo salivar, reduzindo assim a efetividade da saliva em promover sua atividade de limpeza nos dentes e mucosa, tornando o pH bucal ácido. As ações tampão e de limpeza apresentam-se ineficazes porque as atividades microbianas e eletrolíticas da saliva também passam a ser inadequadas. Além disso, tem-se ainda a dificuldade dos pacientes em promover higienização dos dentes associada ao aumento das dietas cariogênicas (Lieshout e Bost, 2014). Na maioria das vezes, essas lesões de cáries de irradiação são visíveis como uma coloração marrom do esmalte ou da dentina, principalmente localizada nas regiões cervical e incisal dos dentes (Jansma et al., 1993; Silva et al., 2009).

A cárie dental é definida por um processo altamente destrutivo dos tecidos mineralizados devido à ação bacteriana na cavidade oral e pode ser descrita como um processo de desmineralização e remineralização dos tecidos (Larsen e Brun, 1995). Assim, até que seja mantido na cavidade bucal um pH maior que 5,5 a composição da saliva supera (supersaturante) em cálcio (Ca) e fosfato (PO_4) o produto de solubilidade da hidroxiapatita (HA). Logo, a tendência físico-química é o dente ganhar Ca e PO_4 do meio-bucal. Quando atinge-se na cavidade bucal um pH menor que 5,5 a composição da saliva em $\text{Ca} \times \text{PO}_4$ torna-se inferior (subsaturante) em relação ao produto de solubilidade da HA, e, deste modo, a tendência físico-química é o esmalte perder Ca e PO_4 para o meio bucal tentando atingir o novo estado de equilíbrio em função do pH atingido. Isto ocorre na placa dental toda vez queingere açúcar, e atingindo o pH inferior a 5,5 ocorrerá como consequência dissolução do esmalte, fenômeno este chamado de desmineralização. Dinamicamente, em função de uma série de fatores e depois de decorrido um certo tempo, o pH retornará ao normal. Desta maneira, são restabelecidas novamente na cavidade as condições físico-químicas supersaturantes, de modo que a tendência é o esmalte ganhar Ca e PO_4 do meio bucal tentando repor o perdido pelo processo de desmineralização. Este fenômeno se efetivo levará ao que chamamos de remineralização do esmalte (Legeros, 1999).

O flúor tem provado ser um tratamento eficaz para a prevenção da cárie dentária, inibindo a desmineralização, reforçando a remineralização, reduzindo a atividade metabólica de bactérias, assim como a permeabilidade do esmalte (Featherstone, 1999). O flúor pode interagir com o esmalte de duas formas, se ligando fracamente (sob a forma de cristais de fluoreto de cálcio - CaF_2), e ou se ligando fortemente ao esmalte (sob a forma de fluorapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) (Newbrun, 1978; Larsen e Brun, 1995; Featherstone, 1999; Cury, 2001; Ferjeskov e Kidd, 2005). O fluoreto de cálcio, ou flúor fracamente ligado, é o responsável pelo potencial cariostático dos produtos de aplicação tópica e, por meio de sua lenta dissolução e sua prolongada retenção atua como um reservatório de flúor frente às quedas bruscas de pH (Ferjeskov, 2005). É caracterizado por seu depósito globular sobre o esmalte e sua solubilidade em

hidróxido de cálcio (KOH) (Larsen e Brun, 1995). Portanto, é formado quando há, pelo menos, 1.000 ppm de flúor na solução que está entrando em contato com o esmalte, o que facilmente ocorre após a aplicação tópica profissional de flúor. O fluoreto de cálcio não está puro sobre o esmalte, mas sim contaminado com fosfato ou proteínas salivares. A formação de fluoreto de cálcio é potencializada quanto maior for a concentração de fluoreto que estiver disponível, além de depender do pH do meio (Featherstone, 1999).

A precipitação de cristais tipo fluoreto de cálcio é maior nas lesões cariosas devido à sua porosidade, tratando-se do mecanismo chave para a redução destas lesões. Porém, essa camada protetora é facilmente dissolvida pela ação dos ácidos, tornando limitada a sua eficácia (Ganss et al., 2004). Assim, as aplicações tópicas de flúor devem ser frequentemente repetidas para se modificar as propriedades do esmalte e garantir o efeito anti-cariogênico (Cury, 2001). Além disso, durante o desafio cariogênico o fluoreto de cálcio libera íons flúor que podem contribuir para essa proteção, pois estes são subsequentemente incorporados ao esmalte dental como hidroxiapatita ou fluorapatita, resultando na redução de sua dissolução (Jordão, 2011).

A fluorapatita é obtida quando há a incorporação do fluoreto na estrutura do esmalte, a qual é menos solúvel e apresenta-se como cristais maiores e mais estáveis quimicamente que a hidroxiapatita (Legeros, 1999). Assim durante a remineralização, os íons flúor presentes em solução, em concentrações menores que 50 ppm, adsorvem-se aos cristais de hidroxiapatita carbonatada parcialmente dissolvidos, atraíndo íons cálcio e propiciando a formação do composto fluorapatita (Featherstone, 1999). Assim, a presença de fluoreto no ambiente oral promove a formação de apatitas menos solúveis e a inibição da formação de compostos fosfatados (fosfatos de cálcio) mais ácidos e mais solúveis, tais como o fosfato de octacálcio e de fosfato tricálcio tipo beta (Legeros, 1999). Não existe um protocolo aceito universalmente para a gestão de cárie de radiação, no entanto, a importância de fluoreto é bem reconhecida (Beech et al., 2014). Há trabalhos mostrando que a aplicação tópica diária de gel de fluoreto de sódio neutro a 1% com o uso de moldeiras personalizadas reduz a cárie de radiação (Jansma et al., 1989; Caielli et al., 1995).

É oportuno mencionar que a maioria dos trabalhos dedicados a investigar o impacto da radioterapia sobre a estrutura dental é baseada em modelos experimentais de radioterapia *in vitro*, muitas vezes lançando mão de protocolos que não reproduzem adequadamente a radioterapia e seus efeitos colaterais em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Possivelmente, esta dificuldade de reprodução de todas as variáveis envolvidas no processo de início e progressão da cárie em pacientes oncológicos pós-radioterapia seja a base para explicar os resultados divergentes encontrados na literatura científica pertinente a este assunto. Neste sentido, é importante estimular o desenvolvimento de novos modelos experimentais mais fidedignos ao complexo ambiente bucal de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e dos protocolos de radioterapia direcionados aos pacientes em questão, permitindo uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos na etiologia da cárie de irradiação (Silva, 2014). Diante do exposto acima, torna-se importante entender mais profundamente como a radioterapia altera as propriedades do esmalte irradiado; como o processo de desmineralização-rem mineralização (des-re) influencia na instalação e progressão da cárie de irradiação e se a aplicação tópica do flúor durante o procedimento da radioterapia teria algum efeito na prevenção da cárie de irradiação. A hipótese deste trabalho é que o protocolo de radioterapia e ciclagem de pH causam alterações nas propriedades biomecânicas do esmalte e que a aplicação tópica de flúor interfere neste processo.

2 - PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da radioterapia, da aplicação tópica de flúor e da ciclagem de pH na composição química, nas propriedades mecânicas e na morfologia do esmalte.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Delineamento experimental

1. Unidade experimental: Terceiros molares humanos extraídos.

2. *Fator em estudo:* Irradiação em três níveis (esmalte não irradiado, esmalte irradiado em umidade relativa e esmalte irradiado em flúor gel neutro a 2%); Ciclagem de pH (sem ciclagem e com ciclagem).
3. *Variável resposta:* Composição química do esmalte (Razão Matrix:Mineral – M:M, Conteúdo Relativo de Carbono – CRC, e cristalinidade); Microdureza Vickers (VHN) e Módulo de elasticidade (*E*); Morfologia do esmalte.
4. *Método de análise:* Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR); Microindentação Dinâmica; Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
5. *Método estatístico:* Para os resultados da análise por FTIR foi realizado Análise de variância em dois fatores (ANOVA), seguido do teste de Tukey; Dados de Microdureza Vickers e Módulo de elasticidade foram analisados utilizando Análise de variância em três fatores (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura foram analisadas qualitativamente.

3.2 - Obtenção e armazenamento dos dentes

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (No. 37868814.6.0000.5152) e consentimento informado dos pacientes, terceiros molares recém-extraídos foram coletados e armazenados em água deionizada a uma temperatura de 4°C. Os dentes foram limpos com curetas periodontais Gracey (Hu-Friedy Co., Chicago, IL, EUA) a fim de remover debris orgânicos e inorgânicos. Em seguida, utilizou-se escova de Robson (Roda, Microdont Ltda., São Paulo, SP, Brasil), montada em micromotor, em baixa rotação, com pasta de pedra pomes (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) e água deionizada. Os dentes foram examinados em lupa estereoscópica para a evidência de cárie, hipoplasia do esmalte, e outros defeitos. Trinta dentes hígidos foram selecionados (Figura 1) e aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais (n = 10): NI - esmalte não irradiado; IU - esmalte em umidade relativa; IF - esmalte irradiado em flúor gel neutro a 2%. Dentro de cada grupo, os dentes foram subdivididos em dois subgrupos (n = 5) de acordo com a ciclagem de pH: com e sem ciclagem de pH (Figura 2).



Figura 1. Padrão dos molares selecionados para o estudo.

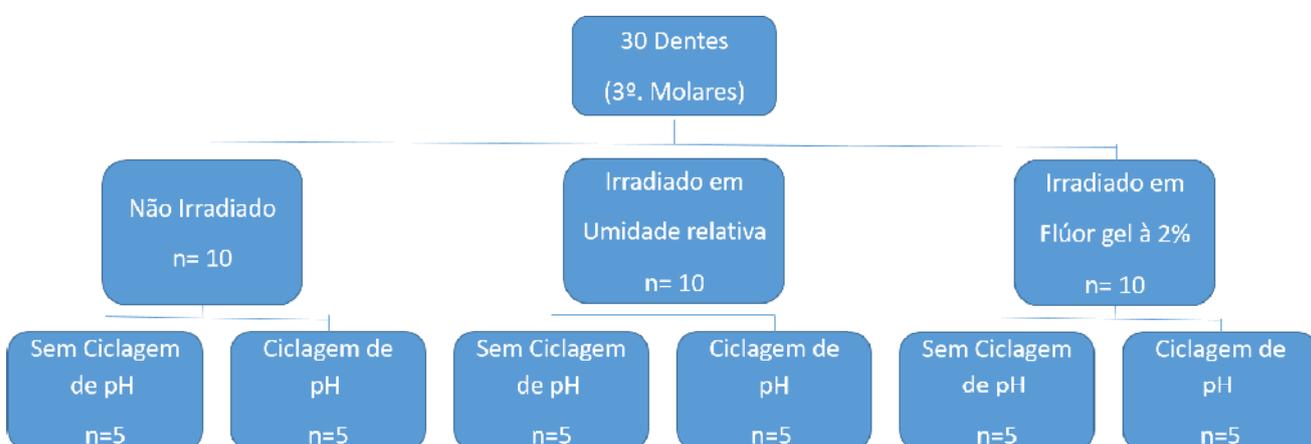


Figura 2. Divisão dos dentes em grupos e subgrupos.

3.3 - Protocolo radioterápico

Os dentes dos grupos IU e IF foram submetidos ao protocolo clínico radioterápico utilizado pelos pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, Uberaba – MG, utilizando o equipamento acelerador linear (Acelerador Linear - Clinac 600C Varian® - Feixe de 6 MV) (Figura 3). Os dentes receberam 2 Gy de irradiação diária, cinco dias por semana, durante sete semanas, totalizando 70 Gy. Para padronizar a posição dos dentes durante a radioterapia, marcações eram feitas pelo Telêmetro na superfície de um bolus (compressas dobradas e umedecidas) posicionado sobre os espécimes de cada grupo no momento da radiação (Figura 4). A energia nominal deste acelerador é de 6 MV, e, para esta energia a absorção máxima de

raios X se dá a 1,5 cm de profundidade. Por isso usa-se o Telêmetro para marcar a distância da fonte até a superfície do bolus e da superfície da bolus até as coroas dos dentes existe uma distância de 1,5 cm de água. Dessa forma os raios X, ao interagirem com a água do bolus (100 cm da fonte) irão depositar a máxima quantidade de energia a 1,5 cm da superfície do bolus, coincidindo com as coroas dos dentes. Da mesma forma que acontece com os pacientes submetidos a radioterapia no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, metade da radiação (1Gy) foi realizado com o feixe sendo direcionado de cima para baixo, girava-se o cabeçote do Acelerador Linear e a outra metade de feixes raios X era então disparada de baixo para cima.



Figura 3. Acelerador Linear Clinac 600C Varian®.

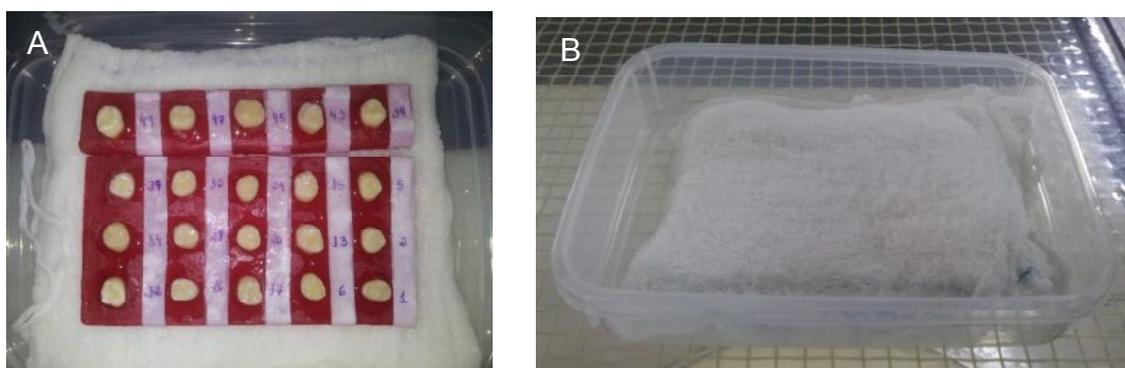


Figura 4. Posicionamento dos dentes em cera (A) e posicionamento do bolus sobre a coroa dos dentes (B).

Nas coroas dos dentes do grupo IF, previamente a radiação de 2Gy diários, aplicava-se uma camada de flúor gel neutro a 2%, a qual permanecia em contato por 3 minutos. Após a radiação, era realizado um enxágue do gel em água deionizada por 10 segundos e os dentes voltavam a ser submergidos em água deionizada até a próxima sessão de radioterapia. O mesmo acontecia para os dentes do grupo IU, ou seja, eram submergidos em água deionizada até a próxima sessão de radioterapia à temperatura ambiente após a radiação ionizante (Figura 5).

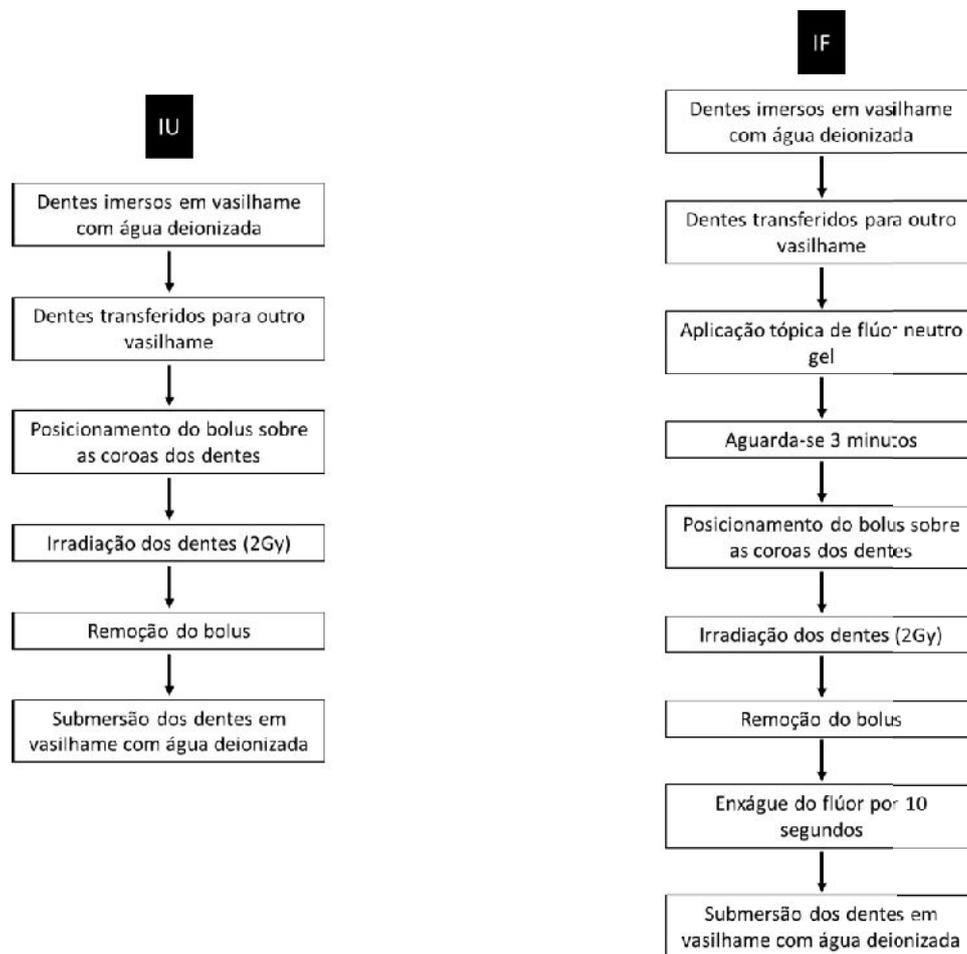


Figura 5. Fluxograma do protocolo radioterápico.

Todos os grupos de espécimes foram armazenados em água deionizada, trocada semanalmente e armazenados à temperatura ambiente.

Os dentes do grupo não irradiado foram armazenados em água deionizada a uma temperatura de 4°C até a realização das metodologias propostas.

3.4 - Preparo dos espécimes

Os dentes foram inicialmente fixados em placa de acrílico com cera pegajosa em bastões (Kerr Corporation, CA, USA) e seccionados com disco diamantado de dupla face (Exttec, EUA) montado em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob refrigeração, 1mm abaixo da junção amelocementária para remoção das raízes. Cinco dentes de cada grupo experimental que seriam submetidos a ciclagem de pH, tiveram suas câmaras pulpares impermeabilizadas com resina acrílica e suas coroas impermeabilizadas por meio da aplicação de duas camadas de verniz ácido resistente (esmalte para unha, Gabriele - Colorama Ltda, São Paulo, Brasil), com exceção de uma área de dimensões aproximadas de 9 mm de largura x 3 mm de altura, localizada no terço médio das faces vestibulares e linguais das coroas dentárias.

Para as análises, cada coroa foi então seccionada na direção mesio-distal, resultando em duas hemi-secções, que correspondem à hemi-secção vestibular e a hemi-secção lingual. Todas as hemi-secções vestibulares foram ainda seccionadas de forma a obter dois espécimes (3 x 2,7 mm) a partir do terço médio. As metades vestibulares mesiais foram destinadas para a análise por meio de Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR), e as metades vestibulares distais para a avaliação da microdureza Vickers e módulo de Elasticidade (Figura 6).

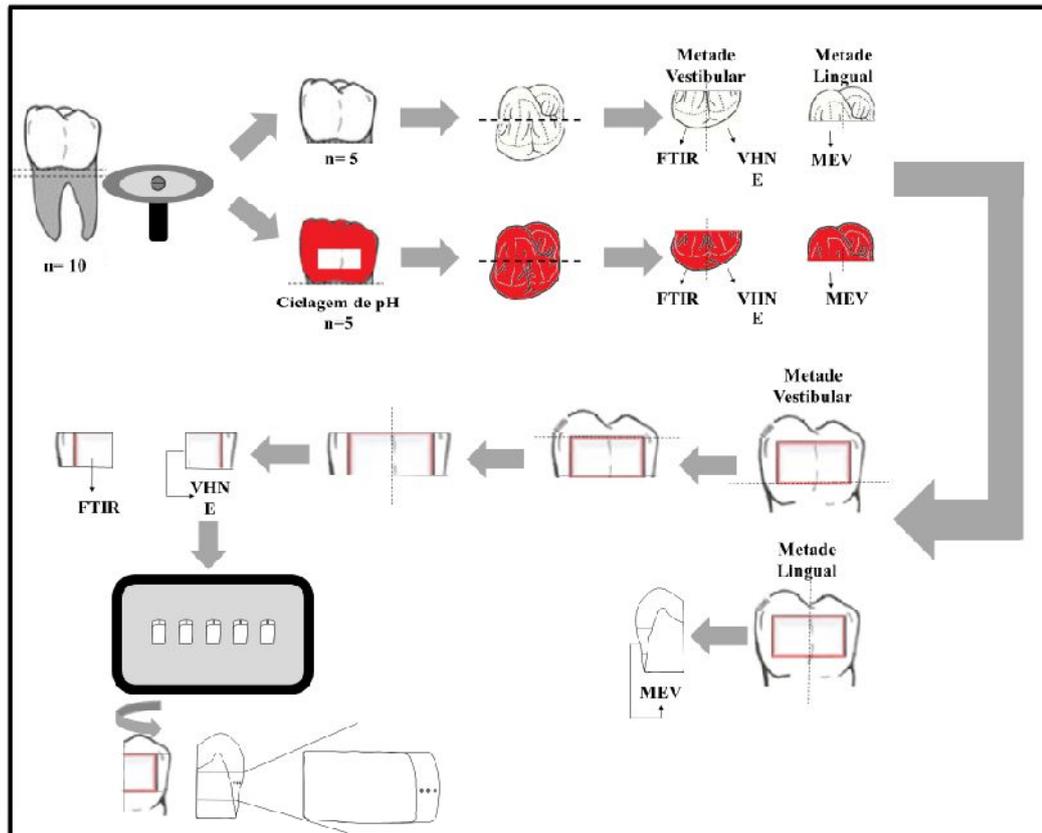


Figura 6. Esquema ilustrativo do preparo dos espécimes.

3.5 - Ciclagem de pH

Os espécimes designados para a ciclagem de pH passaram por um modelo de ciclagem dinâmica de desmineralização e remineralização proposto por Featherstone (1986) e modificado por Geraldo-Martins et al. (2013).

A solução desmineralizadora composta por: 2,0mM de cálcio, 2,0mM de fosfato e ácido acético 75mM, em pH=4,3, ajustado por meio de solução de KOH (hidróxido de potássio) 1M; e a solução remineralizadora composta por: 1,5mM de cálcio, 0,9mM de fosfato, 150mM de cloreto de potássio, em pH=7,0, também ajustada por meio de solução de KOH 1M, foram formuladas segundo as quantidades descritas nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 - Componentes da solução desmineralizadora (quantidade calculada para 1000mL)

CaCl ₂ 2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado	2,0 mM	0,29 g/L
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Fosfato de sódio monohidratado	2,0 mM	0,30 g/L
C ₂ H ₅ OH	Ácido Acético	0,75mM	2,87 mL/L

Quadro 2 - Componentes da solução remineralizadora (quantidade calculada para 1000mL)

CaCl ₂ 2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratao	1,5mM	0,22 g/L
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Fosfato de sódio monohidratado	0,90mM	0,15 g/L
KCl	Cloreto de potássio	0,15M	11,18 g/L

As coroas foram inicialmente imersas individualmente em 67,5mL da solução desmineralizadora (1,25ml/mm²), permanecendo por seis horas. Após completar as seis horas, elas foram então enxaguadas em água deionizada corrente, por 10 seg, e cuidadosamente secas com jatos de ar, para serem colocadas em 33,48mL da solução remineralizadora (0,62ml/mm²), onde permaneceram por dezesseis horas. Quando estas se completaram, configurou-se assim um ciclo de pH. Novamente as coroas foram lavadas, secas e recolocadas na solução desmineralizadora.

Este procedimento experimental teve a duração total de quatorze dias. O procedimento de ciclagem foi repetido durante cinco dias consecutivos, quando então, os espécimes permaneceram por dois dias em solução remineralizadora. As soluções foram substituídas e deu-se início a mais cinco dias de ciclagem e a mais dois dias de permanência na solução remineralizadora (Figura 7). Durante todo o processo, os espécimes permaneceram em estufa a 37°C, exceto nos intervalos de lavagem e alternância das soluções.

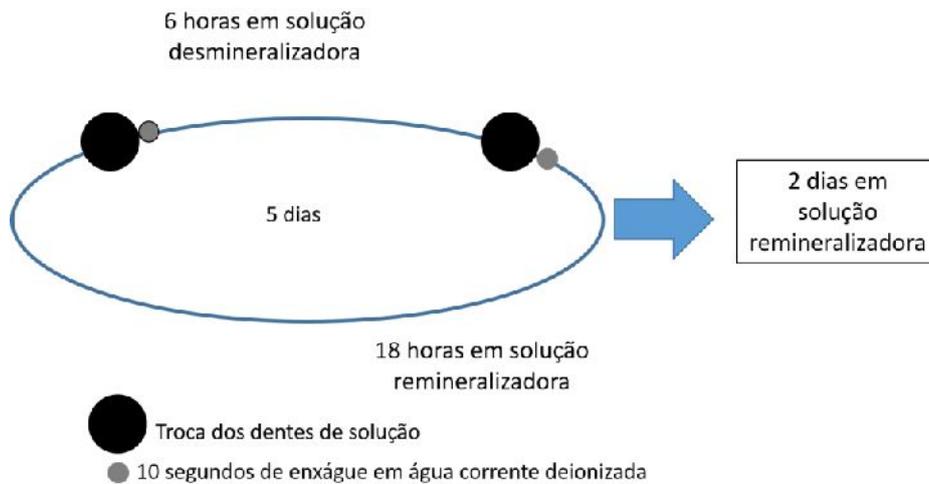


Figura 7. Esquema da ciclagem de pH. Processo foi repetido por duas vezes, totalizando quatorze dias de ciclagem.

3.6 - Avaliação por Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR)

Cinco espécimes de cada grupo foram utilizados para avaliação química do esmalte. Essa avaliação foi realizada utilizando Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (Vertex 70, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA) por meio da Técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR) (Figura 8 – A).

A superfície testada foi posicionada em contato com o cristal de diamante da unidade ATR e pressionada constantemente por uma garra para aumentar o contato do espécime com o cristal (Figura 8 - B).

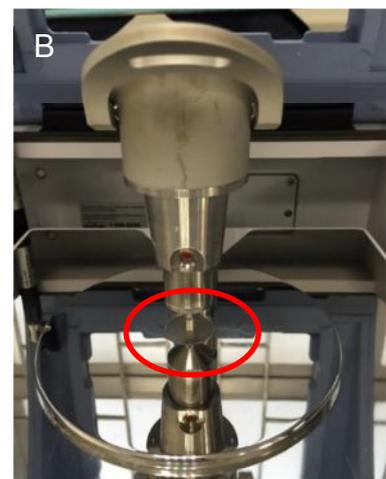


Figura 8. A) Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier – Vertex 70. **B)** Espécime posicionado para análise da composição química do esmalte sobre o cristal de diamante do ATR.

Os espectros foram registados no intervalo de 400-4.000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 128 escaneamentos por espécime. Os espectros foram registrados e analisados com software OPUS 6,5 (Bruker, Ettlingen, Alemanha). Foi realizada correção da linha de base e normalização pela banda fosfato (1190-702 cm^{-1}) dos espectros. Os parâmetros analisados foram: Razão Matriz:Mineral (M:M); o conteúdo relativo de carbonato (CRC) e cristalinidade (Figura 9) (Sa et al., 2012). A M:M (relação entre as áreas integradas das bandas de proteína amida I - 1653 cm^{-1} e ν_1 e ν_3 de fosfato modo de alongamento - 960 cm^{-1} e 1040 cm^{-1}), avalia a quantidade de matriz orgânica em relação à matriz inorgânica. O CRC (razão entre a intensidade total dos dois picos mais fortes de carbonato 1460 cm^{-1} e 1425 cm^{-1} e a intensidade total dos dois picos de fosfato a 605 e 568 cm^{-1}) indica a extensão de incorporação de carbonato na hidroxiapatita de um determinado espécime. E a cristalinidade (relação da intensidade de 1030 pela 1020 cm^{-1}) correlaciona-se com a perfeição e tamanho dos cristais nos domínios da apatita (Reyes-Gasga et al., 2013).

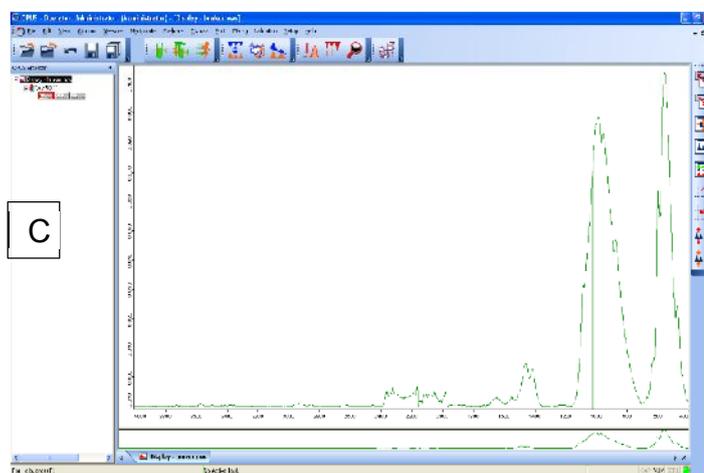
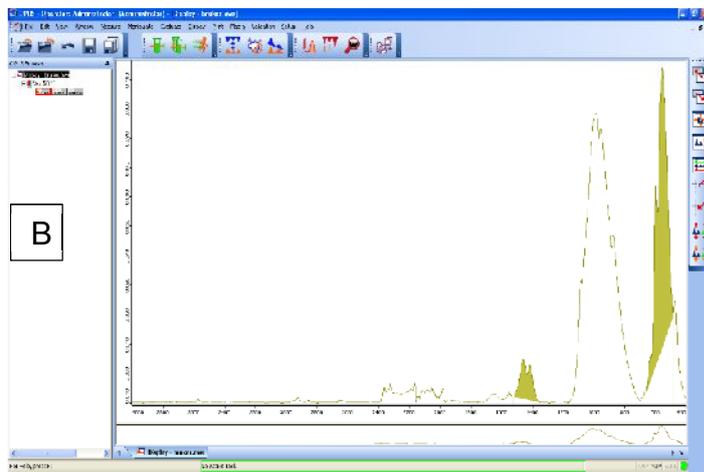
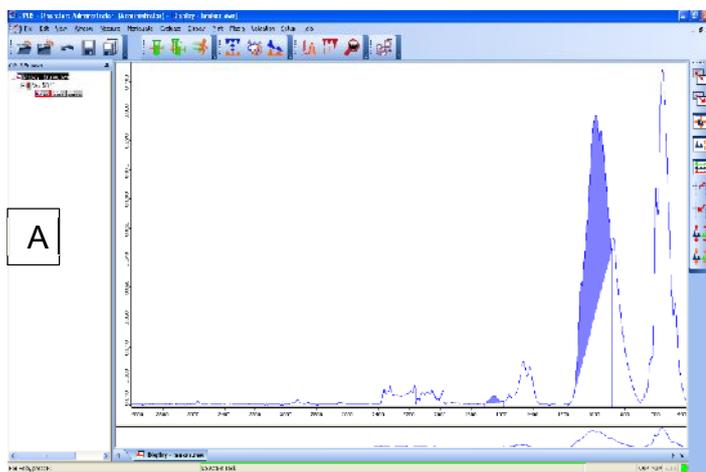


Figura 9. Análise dos espectros por meio do software OPUS 6.5. **A)** Matriz:Mineral; **B)** CRC; e, **C)** Cristalinidade.

3.7 - Teste de microindentação dinâmica

Cinco espécimes de cada grupo foram utilizados para a análise das propriedades mecânicas do esmalte. O preparo dos espécimes foi realizado de acordo com o protocolo já descrito por Soares et al. (2014). Os espécimes (planos sagitais) foram incluídos em resina de poliestireno (Instrumental Instrumentos de Medição Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Para a realização do embutimento, uma pequena gota de cola a base de cianocrilato (Super Bonder Precisão, Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil) era colocada na dentina de cada espécime e esta era então fixada em placa de vidro com a superfície a ser analisada voltada para baixo. Em seguida, um tubo metálico (Metalon Industrias Reunidas, Nova Iguaçu, RJ, Brasil) de 50 mm de comprimento, 30 mm de largura e 10 mm de altura foi posicionado ao redor do espécime e foi fixado com cera (Wilson, Polidental, Cotia, SP, Brasil). A resina de poliestireno foi manipulada e vertida no interior de cada metalon (Figura 10 – A e B).

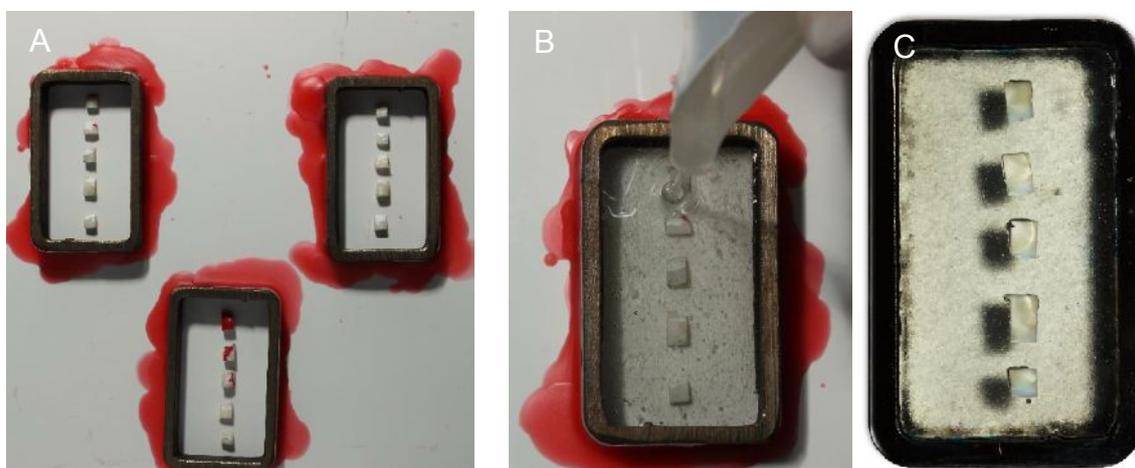


Figura 10. **A)** Espécimes de esmalte posicionadas ao centro do metalon; **B)** Vertimento da resina de poliestireno para inclusão dos espécimes; **C)** Espécimes prontas após o polimento.

Após a presa da resina, todo o procedimento de lixamento e polimento superficial foram realizados em politriz (Arotec S.A. Ind. Com., SP, Brasil). As superfícies foram lixadas inicialmente com lixas de carbeto de silício (nº 600, 800, 1200, 1500, 2000; Norton S/A, Campinas, SP, Brasil) com refrigeração a água

em alta velocidade por 10 min em cada lixa. Em seguida foi feito polimento com discos de feltro (Polishing Cloth, METADI, Buehler, IL, EUA) associados a pastas diamantadas metalográficas (6, 3, 1 e ¼ µm AROTEC, São Paulo, SP, Brasil), em alta velocidade por 5 min em cada feltro seguido de 5 min de banho em ultrassom com álcool absoluto para remoção das impurezas. Foram consideradas satisfatórias quando não foram observados riscos nas superfícies dos corpos de prova (Figura 10 – C). As propriedades micromecânicas: dureza Vickers (VHN) e módulo de elasticidade (E) do esmalte foram obtidos usando um indentador dinâmico de microdureza (CSM Micro-Hardness Tester; CSM Instrumentos, Peseux, Suíça) (Figura 11), do Laboratório de Tecnologia em Atrito e Desgaste da Faculdade de Engenharia Mecânica da UFU. O penetrador do aparelho foi colocado em três regiões diferentes do esmalte: a 40 µm a partir da sua borda exterior (esmalte superficial), a 40 µm a partir da junção amelodentinária (esmalte profundo) e a metade da distância entre as duas indentações (esmalte médio) para determinar valores de dureza Vickers (VHN) em diferentes profundidades (de Siqueira Mellara et al., 2014) (Figura 12). O teste foi realizado com força controlada. O carregamento foi aumentado e reduzido a uma velocidade constante entre 0 a 500 mN em intervalo de 60 seg, sendo o carregamento máximo de 500mN mantido por 15 seg. Em seguida, o carregamento foi gradualmente removido de 500mN a 0mN em intervalo de 60 seg. A carga e a profundidade de penetração do indentador foram medidas continuamente durante o carregamento/descarregamento (Soares et al., 2014; Bicalho et al. 2014). A Microdureza Vickers foi calculada pela fórmula: $VHN = P/A$. onde: P é a carga máxima, A é a área aparente da endentação em força máxima. O módulo de indentação foi calculado a partir da inclinação da tangente da curva de profundidade em força máxima e é comparável com o módulo de elasticidade do material (E) (Soares et al., 2014; Bicalho et al., 2014) e expresso usando a seguinte fórmula:

$$E = 1 - \nu_s^2 \div \frac{1}{E_r} - \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}$$

Onde: E_i é o módulo de elasticidade do penetrador de diamante (1,141 GPa), ν_i é o coeficiente de Poisson do penetrador de diamante (0,07), E_r é o módulo de

indentação da área de contato, e ν_s é o coeficiente de Poisson do esmalte (0,3) (Soons et al., 2010).

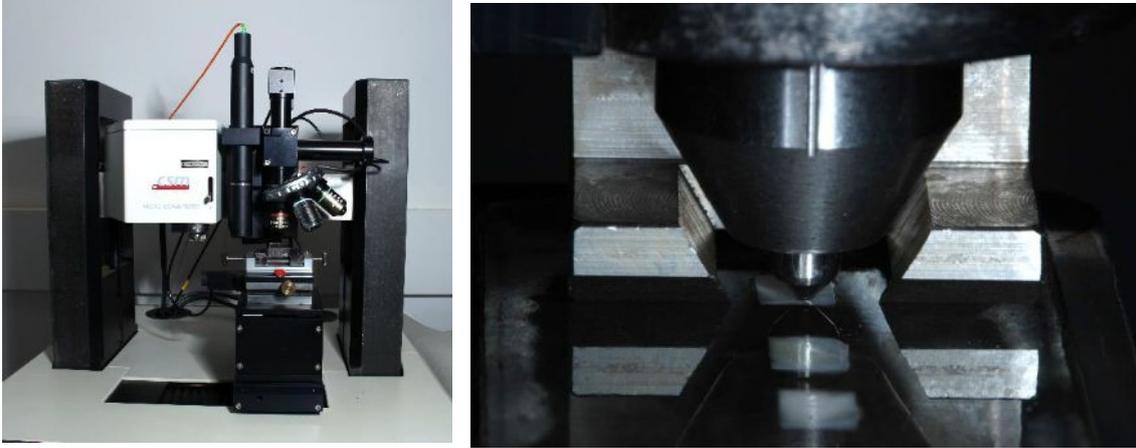


Figura 11. A) Microindentador dinâmico utilizado. B) Visão aproximada da ponta de diamante do indentador no esmalte.

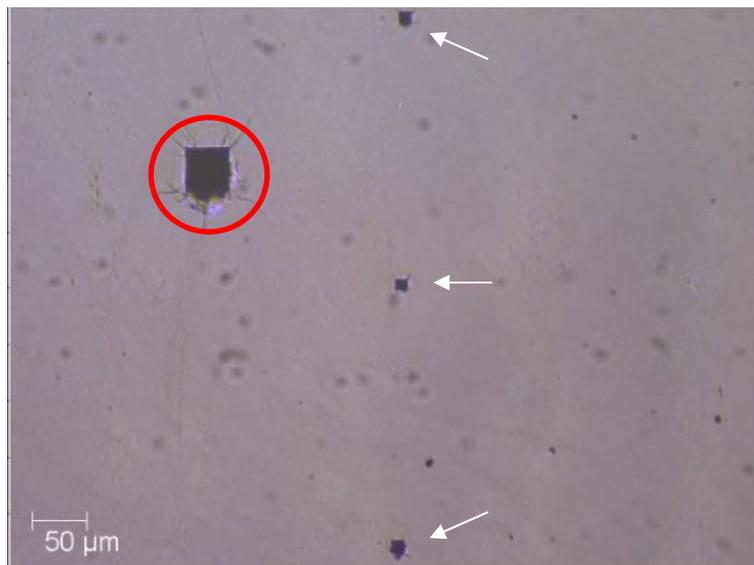


Figura 12. Imagem das indentações realizadas no esmalte superficial, médio e profundo (setas). A indentação maior é realizada primeiramente para calibração do aparelho, indicada pelo círculo vermelho.

3.8 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Três espécimes de cada grupo foram fraturados no sentido sagital e as metades mesiais foram levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) para análise da morfologia do esmalte. Para isto, os espécimes foram limpos em

ultrassom com água deionizada por três ciclos de 10 min. Em seguida, os espécimes foram fixados em glutaraldeído a 2% em solução tampão de cacodilato por duas horas e logo após desidratadas com etanol em soluções crescentes percentuais, ou seja, 30% (10 min), 50% (10 min), 70% (10 min), 80% (10 min), 90% (10 min), 95% (10 min) e 100% (3 X 10 min), e tratadas com hexametildizilasano (HMDS) por 10 min em capela com exaustão (Robles-Ruiz et al., 2014). Os espécimes foram deixados para secarem por 24 horas em estufa e então coladas em suportes metálicos de alumínio (stubs) com o auxílio de fita de carbono condutora. As superfícies tratadas foram posicionadas de forma que ficassem viradas para cima (Figura 13 – A). Foi depositado um filme fino de ouro (de espessura aproximada de 10 nm) sobre as mesmas (metalização) em aparelho Bal-Tec SCD-050 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) (Figura 13 – B). A ultraestrutura do esmalte foi observada por microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 450; LEO Microscópio Eletrônico, Ltda., Cambridge, Reino Unido), operado a 15 kV, no modo de elétrons secundários.

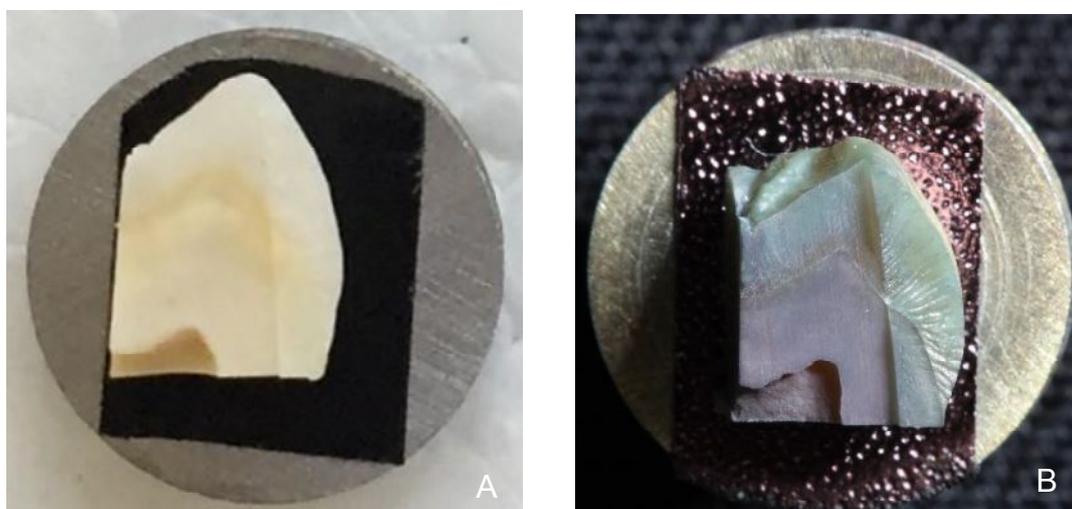


Figura 13. A) Espécime colado no stub; **B)** Espécime após metalização.

3.9 - Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto à distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e teste de igualdade de variâncias (teste de Levene, $p > 0,05$), seguido de testes estatísticos paramétricos. Os parâmetros M:M, CRC e cristalinidade,

foram analisados usando 2-way ANOVA (irradiação e ciclagem de pH). Os dados de Microdureza Vickers e Módulo de Elasticidade foram analisados utilizando 3-way ANOVA, considerando os fatores irradiação, profundidade e ciclagem de pH, seguido do teste de Tukey. Para todos os testes empregou-se um nível de significância estatística de 0,05 e todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico SigmaPlot® Sistema versão 12.0 (Systat Institute Inc., de San Jose, CA, EUA). As imagens da microscopia eletrônica de varredura foram analisadas qualitativamente.

4 - RESULTADOS

4.1 - FTIR

Os espectros dos grupos NI, IU e IF sem ciclagem de pH e com ciclagem de pH estão mostrados na figura 14 (A e B, respectivamente). Em todos os espectros, observou-se a manutenção das principais bandas características de esmalte. Podemos observar que, quando não houve ciclagem de pH, os espectros quase se sobrepõem, a não ser pela banda de amida I, em que o IF mostrou banda com intensidade pouco menor. Após a ciclagem de pH, pode-se observar aumento do conteúdo de matriz orgânica, mas menos pronunciado no IF; e perda de intensidade das bandas CO_3^{2-} ; e maior $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ e bandas ν_4 . Os valores médios da razão M:M, CRC e cristalinidade de acordo com a irradiação e ciclagem de pH são mostrados na Tabela 1. Para a razão M:M, análise de variância em dois fatores revela diferenças estatísticas para irradiação, ciclagem de pH e para a interação entre os fatores ($p < 0,001$). Sem ciclagem de pH, maior razão M:M foi encontrada para IU quando comparado com IF. Após a ciclagem de pH, NI e IU tiveram aumento da razão M:M, uma vez que, tanto a amida I quanto o fosfato ν_1 e ν_3 tiveram aumento de suas intensidades. Para CRC, o fator ciclagem de pH foi significativa ($p < 0,001$), porém o fator irradiação e a interação entre os fatores de estudo não foi significativo ($p = 0,375$; $p = 0,060$). Valores de CRC diminuíram em todos os grupos após a ciclagem de pH. A cristalinidade não foi influenciada pela irradiação ($p = 0,111$) e nem pela interação entre fatores ($p = 0,061$), mas foi afetada pela ciclagem de pH ($p =$

,026). Houve um aumento de cristalinidade para o NI e IF após a ciclagem de pH.

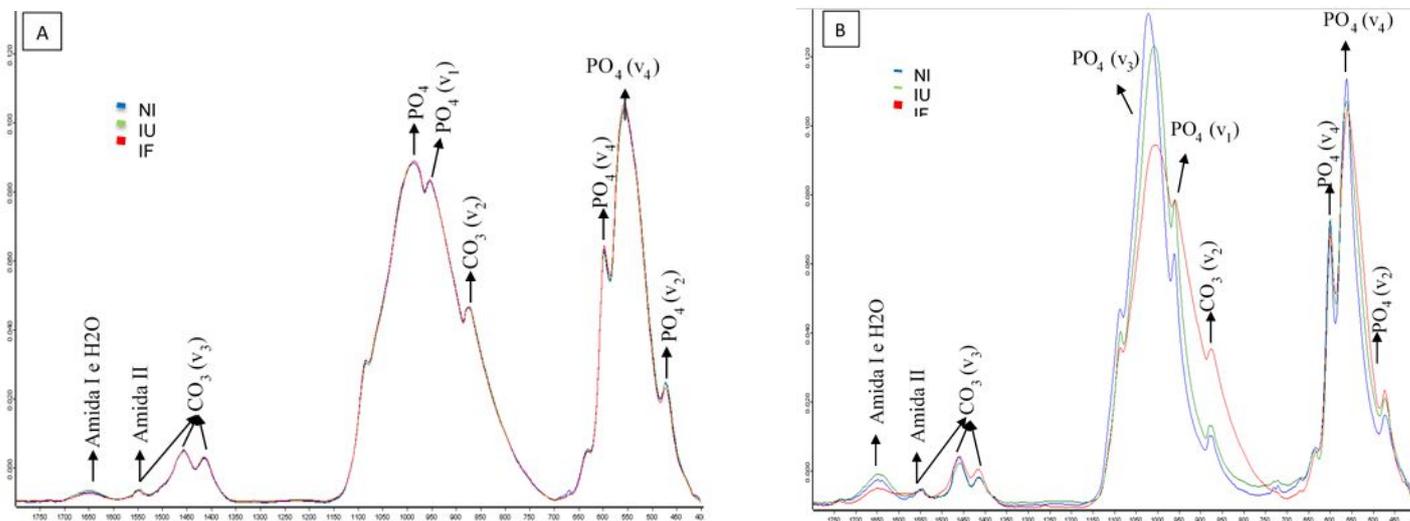


Figura 14. Espectros dos grupos experimentais, sem ciclagem de pH **(A)** e depois da ciclagem de pH **(B)**, respectivamente.

Tabela 1 - Média e desvio padrão (\pm) para M: M, CRC e cristalinidade do esmalte comparando tipo de irradiação e ciclagem de pH.

Irradiação	M:M		CRC		Cristalinidade	
	Sem Ciclagem de pH	Ciclagem de pH	Sem Ciclagem de pH	Ciclagem de pH	Sem Ciclagem de pH	Ciclagem de pH
NI	0,017	0,027	0,179	0,146	0,867	0,937
	$\pm 0,004$ Bab	$\pm 0,001$ Aa	$\pm 0,051$ Aa	$\pm 0,016$ Ba	$\pm 0,010$ Ba	$\pm 0,068$ Aa
IU	0,020	0,026	0,186	0,116	0,872	0,868
	$\pm 0,002$ Ba	$\pm 0,003$ Aa	$\pm 0,019$ Aa	$\pm 0,022$ Ba	$\pm 0,019$ Aa	$\pm 0,032$ Aa
IF	0,013	0,011	0,176	0,149	0,869	0,890
	$\pm 0,004$ Ab	$\pm 0,002$ Ab	$\pm 0,010$ Aa	$\pm 0,015$ Ba	$\pm 0,024$ Ba	$\pm 0,027$ Aa

* Para cada um dos critérios avaliados no estudo (M:M, CRC e Cristalinidade), letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas na horizontal, e letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas na vertical.

4.2 - Microdureza (VHN) e Módulo de elasticidade (E)

Médias e desvios-padrão para valores de VHN de acordo com os fatores irradiação, ciclagem de pH e profundidade do esmalte são apresentados na Tabela 2. 3-way ANOVA revelou diferença significativa para ciclagem de pH ($p < 0,001$). No entanto, não foi encontrada diferença significativa para o fator irradiação ($p = 0,429$), profundidade do esmalte ($p = 0,058$), nem para as interações irradiação e ciclagem de pH ($p = 0,108$), irradiação e profundidade do esmalte ($p = 0,408$), ciclagem de pH e profundidade do esmalte ($p = 0,718$), e nem irradiação, ciclagem de pH e profundidade do esmalte ($p = 0,932$). Os valores mais baixos de VHN foram encontrados para os grupos sem ciclagem de pH.

Tabela 2 - Média e desvio padrão (\pm) para VHN (N/mm²) do esmalte comparando tipo de irradiação, profundidade do esmalte e ciclagem de pH.

Irradiação		Sem ciclagem de pH	Média Agrupada	Ciclagem de pH	Média Agrupada
NI	Superficial	486,7 \pm 133,0 B		619,7 \pm 139,5 A	
	Médio	466,2 \pm 103,3 B	453,0 \pm 102,9 B	613,6 \pm 122,1 A	625,1 \pm 151,9 A
	Profundo	406,1 \pm 102,5 B		642,0 \pm 194,0 A	
IU	Superficial	608,0 \pm 72,9 B		676,2 \pm 68,2 A	
	Médio	512,1 \pm 79,2 B	423,9 \pm 71,6 B	561,4 \pm 60,2 A	589,7 \pm 59,9 A
	Profundo	454,8 \pm 62,6 B		531,5 \pm 51,2 A	
IF	Superficial	489,3 \pm 37,8 B		606,9 \pm 202,8 A	
	Médio	469,1 \pm 28,1 B	479,3 \pm 43,1 B	563,1 \pm 178,2 A	582,3 \pm 192,7 A
	Profundo	479,6 \pm 63,3 B		576,9 \pm 197,0 A	

* Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas na horizontal.

Médias e desvios-padrão para valores de *E* de acordo com os fatores irradiação, ciclagem de pH e profundidade do esmalte são apresentados na Tabela 3. 3-way ANOVA revelou diferença significativa para o fator irradiação ($p < 0,001$), ciclagem de pH ($p < 0,001$) e para a interação irradiação e ciclagem de

pH ($p < 0,001$). No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada para profundidade do esmalte ($p = 0,293$), nem para as interações irradiação e profundidade do esmalte ($p = 0,850$), ciclagem de pH e profundidade do esmalte ($p = 0,619$) e para irradiação, ciclagem de pH e profundidade do esmalte ($p = 0,721$). Sem ciclagem de pH, o grupo IU apresentou valores mais elevados, seguidos pelo IF e consecutivamente NI. Com a ciclagem de pH, NI e IF tiveram valores de E aumentados. Após a ciclagem de pH, NI apresentaram valores mais baixos de E .

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão (\pm) para E (GPa) do esmalte comparando tipo de irradiação, ciclagem de pH e profundidade do esmalte.

Irradiação		Sem ciclagem de pH	Média Agrupada	Ciclagem de pH	Média Agrupada
NI	Superficial	45,45 \pm 3,51 Bc		59,51 \pm 1,41 Ab	
	Médio	45,09 \pm 3,28 Bc	44,30 \pm 3,30 Bc	61,50 \pm 4,96 Ab	61,35 \pm 2,90 Ab
	Profundo	42,37 \pm 3,11 Bc		63,04 \pm 2,35 Ab	
IU	Superficial	70,36 \pm 3,84 Aa		73,19 \pm 7,38 Aa	
	Médio	68,46 \pm 2,18 Aa	68,58 \pm 2,31 Aa	69,11 \pm 7,77 Aa	69,94 \pm 7,09 Aa
	Profundo	66,92 \pm 0,93 Aa		67,52 \pm 6,14 Aa	
IF	Superficial	62,94 \pm 3,72 Bb		75,22 \pm 11,91 Aa	
	Médio	61,22 \pm 3,96 Bb	61,64 \pm 2,89 Bb	73,90 \pm 12,42 Aa	74,07 \pm 11,30 Aa
	Profundo	60,78 \pm 4,37 Bb		73,09 \pm 9,57 Aa	

* Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas na horizontal (ciclagem de pH). Diferentes letras minúsculas apresentaram diferenças significativas na vertical (irradiação).

4.3 - MEV

O esmalte dos grupos NI, IU e IF sem ciclagem de pH exibiram prismas bem organizados, cercados por regiões interprismáticas (Figura 13 A-C). Com a exposição do esmalte à ciclagem de pH, descontinuidade da morfologia externa do dente (contorno vestibular) foi observada de modo mais acentuado no NI que

no IU e uma descontinuidade muito pequena foi observada no IF (Figura 15 D-I).

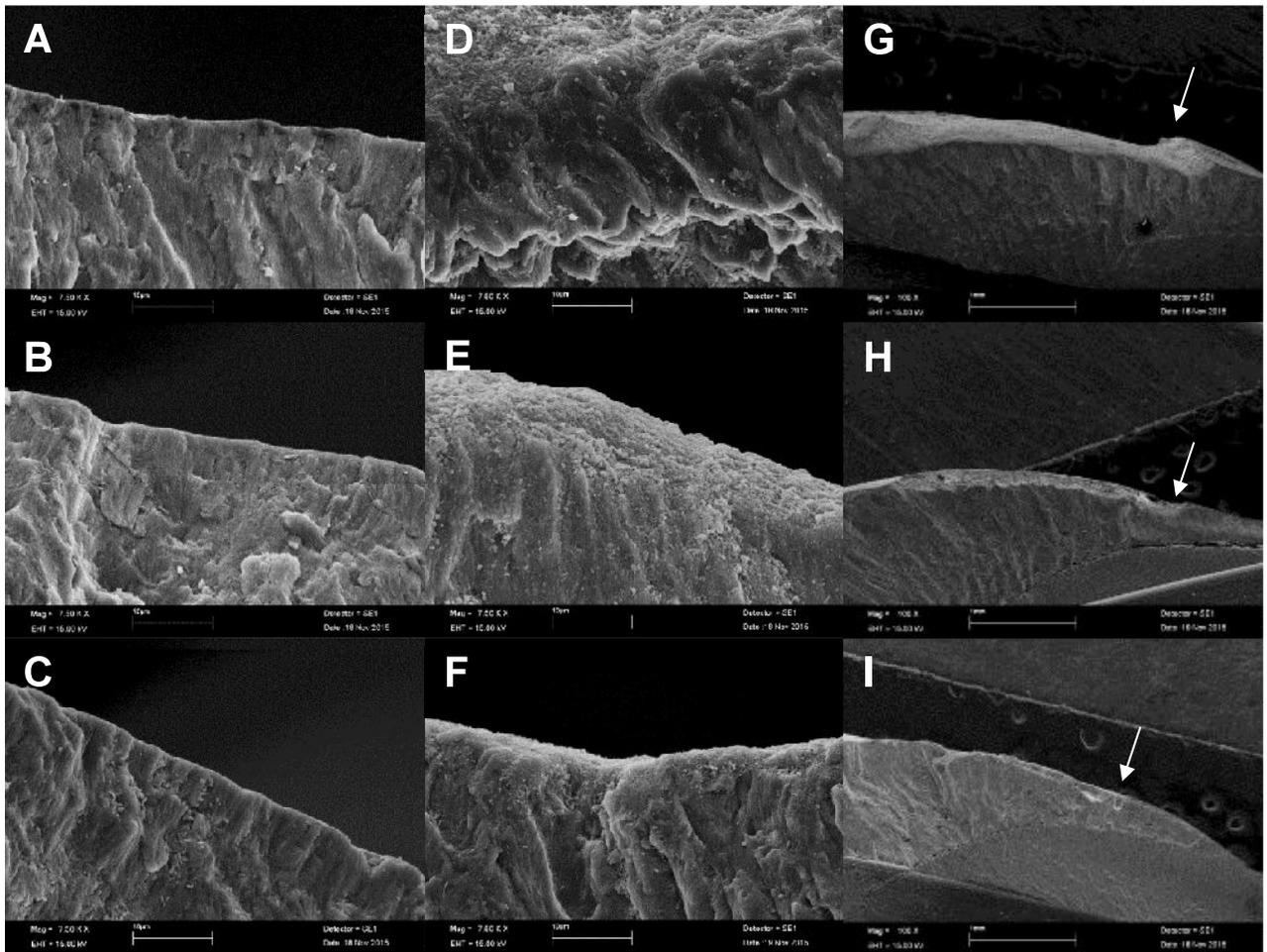


Figura 15. Microscopias eletrônicas de varredura do esmalte. As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura em um aumento de 7.500x (A, B, C, D, E, F) e 100x (G, H, I). A, B, C - imagens do esmalte superficial sem ciclagem de pH. A- esmalte não-irradiado; B- esmalte irradiado em umidade relativa; C- esmalte irradiado em flúor. D, E, F, G, H, I - imagens do esmalte superficial após a ciclagem de pH. D e G- esmalte não-irradiado; E e H- esmalte irradiado em umidade relativa; F e I- esmalte irradiado em flúor. As setas indicam a perda da morfologia externa.

5 - DISCUSSÃO

A radiação ionizante do acelerador linear e a ciclagem de pH alteraram as propriedades mecânicas e a composição química do esmalte dental. Portanto, a

hipótese foi aceita. A radioterapia pode afetar a função oral do paciente para o resto da sua vida e também interferir em sua qualidade de vida (Lieshout e Bots, 2014). A cárie de radiação é a complicação dental mais ameaçadora para os pacientes com câncer de cabeça e pescoço que são submetidos a radioterapia (Silva et al., 2009). Em algumas condições, a dentição pode ser completamente perdida em curtos períodos de tempo (Kielbassa et al., 2006). Ainda não há um consenso a respeito de como os tecidos dentais duros são alterados e como essas mudanças podem contribuir para a rápida deterioração dos dentes (Lieshout e Bots, 2014).

Para entender as mudanças que a radioterapia e a ciclagem de pH causam no esmalte, é necessário considerar a sua composição e microestrutura. O esmalte dental é um tecido epitelial calcificado, acelular após a erupção dentária, composto por 92-96% de fase mineral que consiste essencialmente de fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatita (Gwinnett, 1992; ten Cate, 1994). Os demais componentes são os constituintes da matriz orgânica, tais como proteínas, peptídeos e água (Gwinnett, 1992; ten Cate, 1994). Por se tratar de uma apatita biológica, a apatita do esmalte não é considerada uma hidroxiapatita pura em virtude da inclusão de impurezas como carbonato, sódio, flúor, magnésio, potássio, cloro e outros íons (Nelson, 1981; Aoba, 2004). Essas alterações acarretam mudanças na cristalinidade e nas dimensões dos cristais e tem importante efeito na susceptibilidade do esmalte aos desafios químicos, mecânicos e térmicos (Nelson, 1981, Nelson-Filho et al., 2015). Os cristais de hidroxiapatita têm, em média 50nm de largura em corte transversal e mais de 100nm de comprimento, sendo reunidos numa organização, de aproximadamente 1000 cristais, que originam os prismas de esmalte (Legeros, 1999). Entre os cristais e os prismas existem espaços, denominados espaços intercristalinos e interprismáticos, respectivamente (ten Cate, 1994). Essas regiões são preenchidas por água e material orgânico e constituem a principal via de difusão neste tecido (Featherstone e Rosenbergh, 1984).

A espectroscopia infravermelha transformada de Fourier é um método físico-químico para o estudo das interações energéticas dos compostos

químicos, por meio de uma fonte de luz de frequência fixa. A grande vantagem na utilização deste método consiste na obtenção de uma boa relação sinal/ruído, conseguindo espectros de ótima qualidade em curtos períodos de tempo, além da possibilidade de analisar materiais em suas formas naturais (Pereira, 2003). A análise feita pelo FTIR foi usada para avaliar as mudanças químicas na composição de esmalte. Alterações superficiais na ordem de 10 µm podem ser analisadas por essa técnica (Featherstone et al., 1998). O espectro de absorvância do esmalte é composto basicamente por bandas de água, hidroxiapatita e matriz orgânica (Bachmann et al., 2005). As avaliações das mudanças ocorridas nos grupos funcionais basearam-se na comparação das intensidades relativas das bandas de absorvância sem e com a ciclagem de pH. Neste estudo, o IF sem ciclagem de pH apresentou os menores valores da razão M:M, apresentando-se como um tecido mais mineralizado do que o esmalte dos outros grupos. Isto deve-se a capacidade de os íons fluoreto substituírem os íons hidroxilas na hidroxiapatita, reduzindo o espaço preenchido pela matriz orgânica (Soares et al., 2010), uma vez que ele promove um aumento no tamanho e na espessura dos cristais, além de conferir a ele uma diminuição da deficiência de cálcio. Com a ciclagem de pH, a razão M:M aumentou para o NI e IU, uma vez que ocorreu uma dissolução superficial do conteúdo mineral do esmalte proveniente do contato com ácidos da solução desmineralizadora, expondo mais matriz orgânica. A matriz orgânica influencia a quantidade, a qualidade e a distribuição dos cristais minerais, e pode alterar a arquitetura hierárquica do esmalte e afetar as propriedades mecânicas relacionadas (Sa et al., 2014). O IF manteve os valores da razão M:M semelhante sem e com a ciclagem de pH, mostrando que o flúor protege o esmalte contra quedas de pH, diminuindo sua solubilidade (ten Cate, 1999).

O CRC e a cristalinidade não foram modificados pela radioterapia. Isso deve-se ao fato de que a radiação ionizante tem preferencialmente efeito sobre a matriz orgânica do esmalte, do que sobre a estrutura inorgânica dos dentes (Jansma, 1988; Goncalves et al., 2014). No entanto, com a ciclagem de pH, a cristalinidade aumentou para NI e IF, por outro lado, o CRC diminuiu. Isso aconteceu pois houve uma diminuição do conteúdo de carbonato e aumento do

conteúdo de fosfato, devido as trocas iônicas do esmalte com os íons presentes nas soluções que compunham a ciclagem de pH, corroborando com o aumento das propriedades mecânicas com a ciclagem de pH. O carbonato, impureza que confere maior solubilidade e instabilidade ao esmalte (Xu et al., 2012), representa 3% do peso seco do esmalte, e pode ser incorporado a ele sob duas formas distintas (Newbrun, 1978, Chadwick e Cardew, 1997). A primeira delas, a substituição do tipo A, dá-se quando o carbonato substitui a hidroxila; e a substituição do tipo B, dá-se quando o carbonato substitui o fosfato, sendo a mais evidente na hidroxiapatita biológica, conferindo uma redução no tamanho dos cristais, mudanças na sua morfologia e aumento da sua solubilidade (Sa et al., 2014). As regiões com deficiência de cálcio e ricas em carbonatos são especialmente suscetíveis ao ataque de ácidos dos íons de hidrogênio durante a desmineralização (Featherstone, 1999). Durante a desmineralização, o carbonato é preferencialmente perdido, e durante a remineralização é excluído (Featherstone, 1999). Já durante a remineralização temos a incorporação dos íons fosfato da saliva (meio supersaturado) no esmalte (meio hipersaturado). O fosfato incorporado durante a remineralização (tetracálcio, α -tricálcio) são substancialmente mais solúveis em ácido que o esmalte dentário e a hidroxiapatita (Fowler et al., 1986). Desta forma, os grupos NI e IU em uma nova exposição com quedas bruscas de pH teriam uma maior dissolução mineral do que o IF, pois eles apresentaram um maior ganho de fosfato durante a remineralização, o qual é mais solúvel que o próprio esmalte.

Neste estudo, as propriedades mecânicas do esmalte foram avaliadas usando um teste de indentação dinâmico. Como um tecido biológico complexo, os valores da indentação do esmalte são dependentes de vários fatores, incluindo a localização da indentação, a composição do que será indentado, e os parâmetros da indentação (Cuy et al., 2002; Xu et al., 2012). O módulo de elasticidade é um valor usado para medir a rigidez de um material (Zhang et al., 2014). A radioterapia aumentou o E , tornando o esmalte mais friável, e este pode ser um mecanismo responsável pela delaminação do esmalte frequentemente observada após a radioterapia (Reed et al., 2015). Este aumento do E pode ser justificado pelas alterações ocorridas na estrutura do esmalte devido à radiação

ionizante. Dentre as alterações, observa-se mudanças significativas na área interprismática do esmalte irradiado com a ausência de substância nessa região (Gonçalves et al., 2014).

O conteúdo orgânico tem forte influência na microdureza e resistência à fratura do esmalte, e quando seletivamente removidos, aumenta-se em 23% a microdureza do esmalte, e diminui em 46% a resistência a fratura, enfraquecendo a junção amelodentinária (Baldassarri et al., 2008). Adicionalmente, a radiação altera as ligações proteicas (Baker, 1982) e é capaz de degradar fibrilas colágenas da dentina (Fisher et al., 1971; Pioch et al., 1992; Walker, 1995, Soares et al., 1011 a; Gonçalves et al., 2014). A degradação do colágeno se dá por meio da descarboxilação de ligações laterais de carboxilato de colágeno (Fränzel et al., 2006). Essas ligações são responsáveis pela interação da matriz orgânica da dentina com cristais de apatita, e, com a quebra dessas ligações há redução da interação mineral-orgânica o que gera maior fragilidade ao tecido (Frazel, 2006). Esta alteração do colágeno pode ter afetado a região interprismática do esmalte, uma vez que nesta região concentra-se grande quantidade de proteínas e água (Santin, 2014). O material orgânico neste tecido permite uma melhor distribuição de cargas entre os prismas (ten Cate, 1994), e com a degradação desse material pela radiação ionizante, a capacidade dessa estrutura em absorver e dissipar energia pode ser diminuída e os prismas se tornarem mais friáveis (Santin, 2014). Além disso, a radiação pode afetar as moléculas de água dos tecidos (Baldassarri et al., 2008), formando radicais livres instáveis reativos, como o oxigênio, que pode interferir com biomoléculas e causar danos celulares (Fang et al., 2012). Dessa forma, a degradação da água presente no esmalte dental pode resultar em um tecido hipermineralizado e desidratado, se tornando mais suscetível a fratura (Santin, 2014). Logo, os achados desse estudo, aumento do *E* com a radioterapia e aumento da VHN e do *E* com a ciclagem de pH, são explicados pela diminuição, degradação da matriz orgânica e da água da região interprismática, gerando um tecido mais frágil e friável.

Os modelos de ciclagem de pH foram concebidos para simular as variações dinâmicas da saturação mineral e pH associado com o processo de cárie (White, 1995). Simular eventos específicos do processo de cárie em condições controladas permite a investigação de variáveis mecanicistas individuais, o que seria extremamente difícil de fazer em condições in vivo (White, 1995). No presente estudo, um modelo de ciclagem de pH foi escolhido para simular o desafio cariogênico, pelo qual pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço passam diariamente. Com a ciclagem de pH, o esmalte apresentou um aumento da VHN e do *E*. Na presença de ácidos advindos do meio bucal, uma queda do pH ocorre e conseqüentemente temos início a uma dissolução incipiente do esmalte superficial (Margolis e Moreno, 1990). Em seguida, em um momento de remineralização, é observada uma precipitação de minerais menos solúveis nas porosidades do esmalte formados durante a desmineralização. Neste estudo, o mineral precipitado foi o fosfato presente na solução remineralizadora, confirmando os achados do FTIR, em que um aumento do conteúdo de fosfato foi visualizado com a ciclagem de pH (Margolis e Moreno, 1990; ten Cate, 2015), ratificando o aumento da microdureza.

Um dos fatores em estudo deste trabalho foi a profundidade do esmalte. Apesar de não existirem diferenças estatísticas, o IF apresentou uma certa constância nos valores de dureza e módulo de elasticidade nas três profundidades avaliadas; o que já não ocorreu para o NI e IU, independentemente da ciclagem de pH. Mais uma vez demonstrando a importância do flúor nas modificações das propriedades do esmalte, garantindo seu efeito anti-cariogênico (Cury, 2001).

As imagens da MEV do esmalte após doses de irradiação de 70 Gy não revelaram alterações micromorfológicas. No entanto, quando o dente foi submetido a ciclagem de pH, a morfologia externa apresentou alguma descontinuidade (Fig. 3 GH). Assumindo que o IF exibiu a menor descontinuidade entre os esmaltes ciclados, é possível correlacionar este fato ao resultado da razão M:M (Fig. 3G-H). Uma vez que flúor ajuda a diminuir a solubilidade do esmalte quando este é exposto a quedas pH (ambientes ácidos),

espera-se que o processo de desmineralização ocorra de uma forma menos acentuada que em um esmalte não exposto ao fluoreto.

Mais estudos são necessários para obter-se informações que podem ser utilizadas para a concepção de um desafio cariogênico na tentativa de simular a cárie de radiação, quer seja um modelo biológico ou químico. Estudos clínicos são necessários para confirmar os resultados de estudos in vitro e para criar protocolos, a fim de minimizar ou neutralizar cárie de radiação e danos do tecido duro dental.

6 - CONCLUSÕES

Dentro das limitações do presente estudo, concluiu-se que:

- 1- A radioterapia não alterou as bandas de absorção do conteúdo inorgânico do esmalte. No entanto, o conteúdo orgânico do esmalte aumentou após a radiação ionizante.
- 2- A radioterapia alterou as propriedades mecânicas do esmalte, havendo um aumento do módulo de elasticidade.
- 3- Após a ciclagem de pH, houve remineralização do esmalte, com aumento da cristalinidade e o conteúdo de fosfato, e diminuição do conteúdo de carbonato. Também ocorreu um aumento das propriedades mecânicas.
- 4- O flúor ajudou a manter o conteúdo mineral do esmalte irradiado e ciclado, fazendo com que houvesse uma menor exposição da matriz orgânica e uma manutenção da morfologia externa do mesmo.

REFERÊNCIAS*

1. Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 1. **Aust Dent J**. 2001;46:88-94.
2. Anneroth G, Holm LE, Karlsson G. The effect of radiation to the teeth. **Int J Oral Surg**. 1985;14:269–274.
3. Aoba T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. **Oral Dis**. 2004;10(5):249-57.
4. Aoba T, Takahashi J, Yagi T, Doi Y, Okazaki M, Moriwaki Y. High-voltage electron microscopy of radiation damages in octacalciumphosphate. **J Dent Res**. 1981;60:954–959.
5. Bachmann L, Diebolder R, Hibst R, Zezell DM. Changes in chemical composition and collagen structure of dentine tissue after erbium laser irradiation. **Spectrochimica Acta Part A**. 2005;61:2634–2639.
6. Baldassarri M, Margolis HC, Beniash E. Compositional determinants of mechanical properties of enamel. **J Den Res**. 2008;87:645-9.
7. Baker DG. The radiobiological basis for tissue reactions in the oral cavity following therapeutic x-irradiation. A review. *Arch Otolaryngol*. 1982;108(1):21-4.
8. Beech N, Robinson S, Porceddu S, Batstone M. Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. **Aust Dent J**. 2014;59(1):20-8.
9. Beumer J, Curtis TA, Marunick MT. **Maxillofacial rehabilitation (prosthodontic and surgical considerations)**. St. Louis: Medico Dental Media International; 1996.
10. Bicalho AA, Pereira RD, Zanatta RF, Franco SD, Tantbirojn D, Versluis A, et al. Incremental Filling Technique and Composite Material—Part I: Cuspal Deformation, Bond Strength, and Physical Properties. **Oper Dent**. 2014;39-2, E71-E82.
11. Caccelli EMN, Rapoport A. Para-efeito das irradiações nas neoplasias de boca e orofaringe. **Rev. Brás. Cir. Cabeça e Pescoço**. 2008;37(4):198-201- 208.

12. Caielli C, Martha PM, DIB LL. Sequelas orais da radioterapia: atuação da odontologia na prevenção e tratamento. **Rev. Bras. Cancerol.** 1995; 41(4):231-241.
13. Chadwick DJ, Cardew G. **Dental enamel.** Londres: Chichester-Wiley; 1997.
14. Cheung DT, Perelman N, Tong D, Nimni ME. The effect of gamma irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. **J Biomed Mater Res.** 1990 May;24(5):581-9.
15. Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri LN, et al. **Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades.** São Paulo: Editora Santos; 2001. p.33-68.
16. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. **Arch Oral Biol.** 2002;47(4):281-91.
17. de Siqueira Mellara T, Palma-Dibb RG, de Oliveira HF, Garcia Paula-Silva FW, Nelson-Filho P, da Silva RA, et al. The effect of radiation therapy on the mechanical and morphological properties of the enamel and dentin of deciduous teeth--an in vitro study. **Radiat Oncol.** 2014;9:30.
18. Elliot JC, Holcomb DW, Young RA. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human enamel. **Calcif Crit Rev Oral Biol Dis.** 1985;34(4):372-5.
19. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2014.
20. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition.** 2002;18(10):827-9.
21. Featherstone, JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.** 1999;27:31-40.
22. Featherstone JDB, Fried D, Duhn C. Surface dissolution kinetics of dental hard tissue irradiated over a fluence range of 1-8 (J/cm²) at a wavelength

- of 9.3 mm. **SPIE proceedings Lasers in Dentistry**. 1998 IV, vol. 3248, 146-151.
23. Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: Leach SA. **Factors affecting de- and remineralization of the teeth**. Oxford: IRL Press; 1986. p. 23-34.
24. Featherstone JD; Rosenberg H. Lipid effect on the progress of artificial lesions in dental enamel. **Caries Res**. 1984;18(1):52-55.
25. Ferjeskov O, Kidd E. **Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Editora Santos; 2005.
26. Fisher BV, Morgan RE, Phillips GO, Wardale HW. Radiation damage in calcium phosphates and collagen: an interpretation of ESR spectra. **Radiat Res**. 1971;46(2):229-35.
27. Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. **Calcif Tissue Int**. 1986;38:197-208.
28. Fränzel W, Gerlach R, Hein HJ, Schaller HG. Effect of tumor therapeutic irradiation on the mechanical properties of teeth tissue. **Z Med Phys**. 2006;16:148-154.
29. Ganss C, Klimek J, Brune V, Schurmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentin *in situ*. **Caries Res**. 2004;38(6):561-6.
30. Geoffroy M, Tochan-Danguy HJ. Long-lived radicals in irradiated apatites: An E.S.R. study of apatite samples treated with $^{13}\text{CO}_2$. **Int J Radiat Biol**. 1985;4:621-633.
31. Geraldo-Martins VR, Lepri CP, Palma-Dibb RG. Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. **Lasers Med Sci**. 2013;28(1):33-9.
32. Gerlach RF, Cury JA, Krug FJ, Line SR. Effect of lead on dental enamel formation. **Toxicology**. 2002;175(1-3):27-34.
33. Gonçalves LM, Palma-Dibb RG, Paula-Silva FW, Oliveira HF, Nelson-Filho P, Silva LA, et al. Radiation therapy alters microhardness and

- microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. **J Dent.** 2014;42(8):986-92.
34. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. Histographic study of the direct effects of radiation on dental enamel. **Mund Kiefer GesichtsChir.** 1998;2:85–90
35. Gwinnett AJ. Structure and composition of enamel. **Oper Dent.** 1992;5:10-7.
36. Jansma J, Vissink A, Gravenmade EJ, Visch LL, Fidler V, Retief DH. In vivo study on the prevention of postradiation caries. **Caries Res.** 1989;23(3):172-8.
37. Jansma J, Vissink A, Jongebloed WL, Retief DH, Gravenmade E. Natural and induced radiation caries: a SEM study. **Am J Dent.** 1993;6(3):130–136.
38. Jansma J, Buskes JA, Vissink A, Mehta DM, Gravenmade EJ. The effect of X-ray irradiation on the demineralization of bovine dental enamel. A constant composition study. **Caries Res.** 1988;22(4):199-203.
39. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin.** 2008;58:71-96.
40. Jervøe P. X-ray diffraction investigation on the effect of experimental and in situ radiation of mature human teeth: A preliminary report. **Acta Odontol Scand.** 1970;28:623–631.
41. Jham BC, da AR SF. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. **Rev Bras Otorrinolaringol.** 2006;72(5):704–708.
42. Jordão, MC. **Efeito da irradiação dos laser de CO₂ e Nd:YAG associados ou não ao fluoreto sobre dentina e esmalte hígidos e erodidos quando submetidos a erosão in vitro.** [dissertação] Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2011.
43. Joyston-Bechal S. The effect of X-radiation on the susceptibility of enamel to an artificial caries-like attack in vitro. **J Dent.** 1985;13:41–44.
44. Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. **Radiat-relat Damage Dentition Lancet Oncol.** 2006;7:326–335.

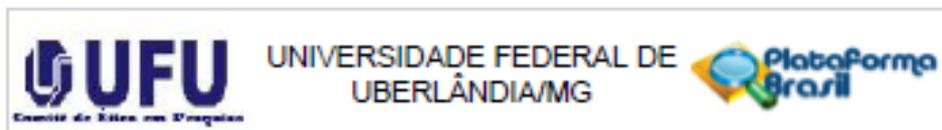
45. Kielbassa AM, Muntz I, Bruggmoser G, Schulte-Mönting J. Effect of demineralization and remineralization on microhardness of irradiated dentin. **J Clin Dent.** 2002;13:104–110.
46. Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. **Arch Oral Biol.** 1999;44:243–251.
47. Larsen MJ, Brun C. A química da cárie dentária e o flúor: mecanismos de ação. In: Thylstrup A, Fejerskov O. **Cariologia Clínica.** 3 ed. São Paulo: Livraria Editora Santos; 2001. p.231-258.
48. Legeros RZ. Calcium phosphates in demineralization/remineralization processes. **J Clin Dent.** 1999; 10(2):65-73.
49. Lieshout HF, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue--a systematic review. **Clin Oral Investig.** 2014;18(1):17-24.
50. Margolis HC, Moreno EC. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. **J Dent Res.** 1990;69:606-13.
51. Nectarios Andrews, Chris Griffiths. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 1. **Australian Dental Journal.** 2001;46:(2):88-94.
52. Nelson DG. The influence of carbonate on the atomic structure and reactivity of hydroxyapatite. **J Dent Res.** 1981;60:1621-1629
53. Nelson-Filho P, Rossi CR, Gomes-Silva JM, Faraoni-Romano JJ, Lucisano MP, da Silva RA, et al. Enamel permeability and resistance to acid challenges after systemic use of sodium alendronate: a study in rat teeth. **Clin Oral Investig.** 2015 Nov.
54. Newbrun, E. **Cariology.** Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1978:229.
55. Novelline, Robert A. **Fundamentos de Radiologia.** Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda; 1999.
56. Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, Urbano TG, Bhide SA, Clark C, Miles EA, Miah AB, Newbold K, Tanay MA, Adab F, Jefferies SJ, Scrase C, Yap BK, A'hern RP, Sydenham MA, Emson M, Hall E. Parotid-sparing

- intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. **Lancet Oncol.** 2011;12(2):127–136.
57. Pereira, AA. **Alterações químicas e físicas de tecidos duros irradiados por laser de neodímio chaveado.** [tese] São Paulo; Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP; 2003.
58. Pioch T, Moller D, Staehle HJ, Hoppe W. Solubility of enamel and synthetic hydroxylapatite on irradiation. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift.** 1991;46:413–415.
59. Pioch T, Golfels D, Staehle HJ. An experimental study of the stability of irradiated teeth in the region of the dentinoenamel junction. **Endod Dent Traumatol.** 1992;8:241-244.
60. Reed R, Xu C, Liu Y, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. **Arch Oral Biol.** 2015;60(5):690-7.
61. Reyes-Gasga J, Martinez-Pineiro EL, Rodriguez-Alvarez G, Tiznado-Orozco GE, Garcia-Garcia R, Bres EF. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** 2013;33(8):4568-74.
62. Robles-Ruíz JJ, Arana-Chavez VE, Ciamponi AL, Abrão J3 Kanashiro LK. Effects of sandblasting before orthophosphoric acid etching on lingual enamel: In-vitro roughness assessment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** 2015 Apr;147(4 Suppl):S76-81.
63. Ruiz MT, Pavarino-Bertelli E, Maniglia JV, Ruback MJC, Goloni-Bertollo EM. Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço. **Arq Ciênc Saúde.** 2006 Jan-Mar;13(1):34-8.
64. Santin, GC. **Propriedades físicas e adesivas do esmalte dental após radioterapia e colagem de bráquetes ortodônticos.** [tese] Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP; 2014.
65. Silveira A, Gonçalves J, Sequeira T, Ribeiro C, Lopes C, Monteiro E, et al. Head and Neck Cancer: Health Related Quality of Life Assessment

- considering clinical and epidemiological perspectives. **Rev Bras Epidemiol.** 2012 Mar;15(1).
66. Sa Y, Liang S, Ma X, Lu S, Wang Z, Jiang T, et al. Compositional, structural and mechanical comparisons of normal enamel and hypomaturational enamel. **Acta Biomater.** 2014;10(12):5169-77.
67. Seikaly H, Jha N, Harris R, Barnaby P, Liu R, Williams D, McGraw T, Rieger J, Wolfaardt J, Hanson J. Long-term outcomes of submandibular gland transfer for prevention of postradiation xerostomia. **Arch Otolaryngol head Neck Surg.** 2004;130:956–96.
68. Shannon IL, Wescott WB, Starcke EN, Mira J. Laboratory study of cobalt-60-irradiated human dental enamel. **J Oral Med.** 1978;33:23–27.
69. Shulin W. Human enamel structure studied by high resolution electron microscopy. **Electron Microsc Rev.** 1989;2:1–16.
70. Silva ARS, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation related caries. **Caries Res.** 2009;43:43–49.
71. Silva, Wagner Gomes da M. **Avaliação das alterações morfológicas, da expressão imunoistoquímica de metaloproteinases de matriz e da atividade gelatinolítica em dentes expostos à radioterapia na região de cabeça e do pescoço.** [dissertação] Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2014.
72. Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PC, Naves LZ, et al. Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. **J Dent Res.** 2010;89:159-164.
73. Soares CJ, Neiva NA, Soares PB, Dechichi P, Novais VR, Naves LZ, et al. Effects of chlorhexidine and fluoride on irradiated enamel and dentin. **J Dent Res** 2011;90:659–64.
74. Soares PB, Nunes SA, Franco SD, Pires RR, Zanetta-Barbosa D, Soares CJ. Measurement of elastic modulus and Vickers hardness of surround bone implant using dynamic microindentation--parameters definition. **Braz Dent J.** 2014;25(5):385-90.

75. Soons JA, Aernouts J, Dirckx JJ. Elasticity modulus of rabbit middle ear ossicles determined by a novel micro-indentation technique. **Hear Res** 2010;263:33-37.
76. Specht L. Oral complications in the head and neck irradiated patient. Introduction and scope of the problem. **Supp Care Cancer**. 2002;10:36-39.
77. ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odontol Scand**. 1999;57(6):325-9.
78. ten Cate JM. Models and role models. **Caries Res**. 2015;49(Suppl 1):3-10.
79. ten Cate AR. **Oral histology: development, structure and function**. St Louis: MO: Mosby; 1994.
80. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP. Orale sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit Rev Oral Biol Med**. 2003;14(3):199–212.
81. Xu C, Reed R, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. The Distribution of Carbonate in Enamel and its Correlation with Structure and Mechanical Properties. **J Mater Sci**. 2012;47(23):8035-43.
82. Walker MP, Wichman B, Cheng AL, Coster J, Williams KB. Impact of radiotherapy dose on dentition breakdown in head and neck cancer patients, author manuscript. **Pract Radiat Oncol**. 2001;1(3):142–148.
83. Wen SL. Human enamel structure studied by high resolution electron microscopy. **Electron Microsc Rev**. 1989;2:1–16.
84. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. **Adv Dent Res**. 1995;9(3):175-93.
85. Wöstmann B, Rasche KR. The influence of radiotherapy on survival time of teeth and restorations. A study on patients with maxillofacial defects. **Zahnärztliche Welt**. 1995;104:627–627.
86. Zhang YR, Du W, Zhou XD, Yu HY. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. **Int J Oral Sci**. 2014;6(2):61-9.

ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da terapia laser-fluór nas propriedades mecânicas, químicas e morfológicas do esmalte de dentes irradiados

Pesquisador: Veridiana Resende Novais

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37868814.6.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.112.000

Data da Relatoria: 24/04/2015

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo:

Câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral, faringe e laringe têm sido reconhecidos como cânceres com alta prevalência (Jemal et al., 2008); é responsável por uma incidência de 900.000 casos novos por ano no mundo (Silveira, A. L. et al.2012), sendo a sexta causa de morte por câncer em todo o mundo (Ruiz et al, 2006). No Brasil em 2012 a estimativa de novos casos era de 14.170, sendo 9.990 homens e 4.180 mulheres (INCA, Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa/2012). Diferentes métodos para tratamento de câncer de cabeça e pescoço estão disponíveis, como: cirurgia, irradiação, quimioterapia ou uma combinação destes tratamentos (Beumer, Curtis e Marunick, 1996). A radioterapia consiste em dirigir uma dose correta de radiação para a massa tumoral, tentando minimizar a dose recebida por áreas fora da zona do tumor (Nectarios e Chris, 2001). A maioria dos oncologistas tratam seus pacientes com "fracionamento ideal". Este tratamento consiste de uma dose total de 65 a 72 Gy de radiação de alta energia de raios-x em frações diárias de 1,8 a 2 Gy durante um período de 7 semanas, 5 dias por semana (Jham e da AR, 2006; Klebassa et al., 2006; Nutting et al., 2011; Seikaly et al., 2004; Beumer, Curtis e Marunick, 1996). Apesar da vantagem de preservar a estrutura do tecido, a radioterapia causa

Endereço: Av. João Neves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 204 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.405-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

mudanças adversas na cavidade oral (Specht, 2002; Kleibassa et al., 2006). Muitos tecidos orofaciais são afetados, com radiação ionizante. Alguns dos mais importantes são glândulas salivares, dentes, membranas mucosas, ossos e papilas gustativas (Andrews e Griffiths, 2001). A maior parte das consequências são temporárias, como a perda do paladar, tecidos moles sensíveis ou dolorosos, infecções por fungos e mucosite (Anneroth, Holm e Karlsson, 1985; Jham e da AR, 2006; Kleibassa et al., 2006; Beumer, Curtis e Marunick, 1996). Outras consequências têm um caráter mais permanente como os músculos atrofiados na região da mandíbula, trismo, mudanças da microflora bacteriana e de proteínas e a osteorradionecrose da mandíbula (Jham e da AR, 2006; Kleibassa et al., 2006; Beumer, Curtis e Marunick, 1996). Uma das implicações da radiação de cabeça e pescoço é a hipossalivação que pode causar a xerostomia, sensação de secura da boca (Osalian et al., 2011; Lee et al., 2002) e tem sido documentada quando a produção de saliva não estimulada é reduzida em pelo menos 40% (Dawes, 1987; Wolff e Kleinberg, 1999). A hipossalivação é causada por danos da radiação às glândulas salivares, e tipicamente surge quando excede doses de 15 a 20 Gy (Wescott et al., 1978; Fall-Dickson e Berger, 2007; Eneroth, Henrikson e Jakobsson, 1972). Trinta Gy é o limiar da glândula salivar, além deste nível de radiação, o dano para as glândulas é permanente (Walker et al., 2001). A xerostomia permanente é um dos efeitos tardios mais prevalentes, podendo ocasionar alteração no paladar e facilitando o aparecimento de candidíase e cárie. E por último e não menos importante, ocorrem as alterações na estrutura dentária. A gravidade e a extensão dos efeitos da radiação dependem do conteúdo mineral e orgânico das estruturas do dente. A porção mineralizada é suscetível a danos em sua fase cristalina (Aoba et al., 1981; Kleibassa et al., 1999; Floch et al., 1991), diminuindo suas propriedades mecânicas (Kleibassa et al., 1999) e sua resistência ao desgaste (Jervoe, 1970) e reduzindo a sua resistência ao ataque ácido (Kleibassa et al., 1999). Alterações físicas e químicas do esmalte como resultado direto da radioterapia foram documentadas (Aoba et al., 1981; Geoffroy e Tochan-Danguy, 1985; Jervoe, 1970; Shulin, 1989). Pouco tempo após a irradiação, o esmalte mostra extensa destruição da estrutura prismática (Grötz et al., 1998). Esta desmineralização em esmalte irradiado apresenta um padrão diferente do que o esmalte não irradiado (Grötz et al., 1998; Janoma et al., 1993). O esmalte irradiado mostra-se mais vulnerável a ataques de ácido do que o esmalte saudável (Grötz et al., 1998; Kleibassa et al., 1999; Kleibassa et al., 2002). Também observa-se uma redução da resistência à tração devido a alterações no componente da proteína deste substrato (Goares et al., 2010). A profundidade de desmineralização e solubilidade do esmalte é controverso, alguns estudos têm demonstrado nenhuma diferença entre esmalte irradiado e não irradiados (Wien, 1989; Shannon et al., 1978), outros descrevem uma

Continuação do Pensar: 1.112.000

maior solubilidade após irradiação (Jansma et al., 1988; Joyston-Bechal, 1985), ou até mesmo um ligeiro decréscimo na solubilidade (Ploch et al., 1991). No entanto, alterações importantes de radioterapia em dentina são devidas a danos das fibras de colágeno (Cheung et al., 1990), resultando em uma redução significativa da dureza (Kielbassa et al., 1999), da resistência ao desgaste (Davis, 1975), da tração e da estabilidade da junção amelo-dentinária (Ploch, Golfels, Staehle, 1992). Dentro de 3 meses após a radioterapia na região da cabeça e pescoço os primeiros sinais de deterioração do tecido duro dos dentes são visíveis (Vissink et al., 2003; Wöstmann e Rasche, 1995). Alguns sinais visíveis desta deterioração frequentemente visto são áreas de porosidade do esmalte, formação de cavitações com a exposição do esmalte subsuperficial, ou até mesmo da dentina subjacente. À esta deterioração atípica dá-se o nome de cárie de irradiação e esta aumenta rapidamente e na maior parte sem dor (Jansma et al., 1993; Walker et al., 2001; Kielbassa et al., 2006). Pode-se justificar o aparecimento dessa alteração uma vez que ocorre uma diminuição do fluxo salivar, reduzindo assim a efetividade da saliva em promover sua atividade lubrificante nos dentes e mucosa, tomando o pH bucal ácido. As ações tampão e de limpeza apresentam-se ineficazes porque as atividades microbianas e eletrolíticas da saliva também passam a ser inadequadas. Às vezes, é visível como uma coloração marrom do esmalte ou da dentina. Esta coloração é principalmente localizada nas regiões cervical e incisal dos dentes (Jansma et al., 1993; Silva et al., 2009). O flúor tem-se provado ser um tratamento eficaz para a prevenção da cárie dentária, inibindo a desmineralização, reforçando a remineralização (Wefel, 1990), reduzindo a atividade metabólica de bactérias, assim como a permeabilidade do esmalte (Fried et al., 1996; Maung et al., 2007a; Pandit et al., 2011). Estudos têm demonstrado que um tratamento associando o laser com o flúor faz o esmalte mais resistente ao ácido do que qualquer tratamento de laser ou de flúor isolados (Flaitz et al., 1995; Hsu et al., 2001). Nesse contexto, torna-se importante avaliar o efeito da aplicação do laser associado ao flúor na desmineralização do esmalte irradiado.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo apresenta o protocolo:

Primário: Verificar o efeito da aplicação do flúor, do laser e do laser associado ao flúor nas propriedades mecânicas, químicas e morfológicas do esmalte irradiado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Endereço: Av. João Neves de Ávila 2121 - Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: oep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.112.000

Riscos: O único risco é a identificação do sujeito de pesquisa no momento da coleta do dente, o que contraria a Resolução 466/12, porém a equipe executora se compromete em não revelar em nenhum momento da pesquisa a identidade dos pacientes que aceitarem participar. Os dentes utilizados serão dentes com indicação clínica de exodontia e os pacientes que concordarem farão a doação destes dentes por escrito ao assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Benefícios: científicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo apresenta o protocolo:

Após aprovação no comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia, serão coletados 60 dentes terceiros molares humanos. Esse valor foi obtido após realização de cálculo amostral, considerando que a variável a ser analisada apresenta um desvio padrão em torno de 3,9 Mpa. Considerando ainda uma margem de erro de 2,4 MPa, um nível de confiança de 95%, o tamanho amostral mínimo, de acordo a metodologia sugerida por Fonseca & Martins (2006), é 30 hemisseções por grupo/metodologia. Os dentes serão coletados nas Clínicas de Cirurgia da FOUFU e no Pronto Socorro Odontológico da Instituição. Os dentes deverão ter indicação clínica de exodontia e prévio consentimento dos pacientes que estarão cientes do uso nesta pesquisa e assinarão um termo de doação dos dentes.

Após a obtenção dos dentes, estes serão inicialmente seccionados 1mm abaixo da junção amelocementária e em seguida seccionados no sentido mesio/distal, obtendo-se duas metades, sendo uma correspondente à hemisseção vestibular e outra a hemisseção lingual ou palatina, num total de 120 hemisseções. As hemisseções serão divididas em dois grupos (n=60): Grupo não irradiado; e Grupo irradiado. O grupo irradiado será submetido ao protocolo radioterápico utilizado pelos pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro a partir do equipamento acelerador linear (Acelerador Linear - Clinac 600C Varian® - Feixe de 6 MV), sendo os dentes irradiados com 2 Gy diários, 5 dias por semana durante 30 dias; e grupo não irradiado, armazenado em água destilada e deionizada a uma temperatura de 4°C. Todos os dentes serão submetidos aos tratamentos remineralizadores, podendo ser antes ou após o desafio ácido. As hemisseções serão cobertas com verniz de unhas, deixando expostas 4 janelas de 2X2 mm, aleatoriamente designados para cada tipo de tratamento que será aplicado: controle (C), laser (L), flúor (F), ou laser + flúor (FL). O desafio ácido consistirá em um processo de ciclagem do pH, simulando

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco 11A, sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4035 E-mail: cep@propp.ufu.br

Página 06 de 07

Continuação do Parecer: 1.112.000

o processo de desmineralização-rem mineralização que ocorre na boca. Este trabalho será dividido em dois objetivos: Objetivo específico 1: Avaliar a influência de diferentes tratamentos na prevenção da desmineralização do esmalte de dentes submetidos ao tratamento radioterápico. Nesta primeira parte, serão utilizadas 30 hemiseções de cada grupo e o desafio ácido será realizado após a aplicação das terapias.

Objetivo específico 2: Avaliar a influência de diferentes tratamentos na rem mineralização do esmalte de dentes submetidos ao tratamento radioterápico. Nesta segunda parte do trabalho, também serão utilizadas 30 hemiseções de cada grupo, porém o processo de desmineralização-rem mineralização será realizado anteriormente as terapias. Todas as hemiseções serão submetidas às seguintes avaliações:- 5 hemiseções de cada grupo serão levadas ao Micro-CT para avaliação do perfil mineral; - 5 hemiseções de cada grupo serão avaliadas por meio de microscópio eletrônico de varredura;- 5 hemiseções dos grupos serão avaliadas por meio de microscopia confocal a laser (Microscópio Invertido Confocal LSM 510 Meta);-5 hemiseções de cada grupo serão utilizadas para avaliação química por meio de Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (Vertex 70, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA).- 5 hemiseções de cada grupo serão utilizados para análise das propriedades mecânicas de dureza Vickers (VHN) e módulo de elasticidade (E) usando um Indentador dinâmico de microdureza (CSM Micro-Hardness Tester; Instruments CSM, Peseux, Suíça). -5 hemiseções de cada grupo serão avaliadas por meio de microscópio de luz polarizada.

Apresenta o cálculo amostral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto adequada

Instituição co-participante: Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Cronograma atualizado.

Financiamento próprio.

TCLE adequado.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer número 1.007.501 de 01 de Abril de 2015, foram atendidas.

Endereço: Av. João Neves de Ávila 2121 - Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3238-4131 Fax: (34)3238-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.112.000

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEPI/UFU: Fevereiro de 2016.

OBS.: O CEPI/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEPI/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEPI/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

* O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

* O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos

Endereço: Av. João Neves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.400-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.112.000

grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

UBERLÂNDIA, 17 de Junho de 2015

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Neves de Ávila 2121 - Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.405-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br