

Rafael Resende de Miranda

Efeito da radiação *in vivo* sobre a composição química da dentina humana

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

Uberlândia, 2017

Rafael Resende de Miranda

Efeito da radiação *in vivo* sobre a composição química da dentina humana

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Veridiana Resende Novais Simamoto

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Veridiana Resende Novais Simamoto

Prof^a. Dr^a. Gisele Rodrigues da Silva

Prof. Dr. Eduardo Rodrigues Fregnani

Uberlândia, 2017

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

M672e
2017 Miranda, Rafael Resende de, 1992
 Efeito da radiação in vivo sobre a composição química da dentina humana / Rafael Resende de Miranda. - 2017.
 53 f. : il.

 Orientadora: Veridiana Resende Novais Simamoto.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
 Inclui bibliografia.

 1. Odontologia - Teses. 2. Dentina - Teses. 3. Radioterapia - Teses. 4. Câncer - Radioterapia - Teses. I. Simamoto, Veridiana Resende Novais. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



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 nº308 – COPOD

Data: 13/02/2017

Discente: Rafael Resende de Miranda Matrícula: 11512ODO015

Título do Trabalho: Análise química da dentina irradiada in vivo em pacientes oncológicos de cabeça e pescoço.

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 **treze de fevereiro ano de 2017** no Anfiteatro Bloco 2A, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro 2017, assim composta: Professores Doutores: Gisele Rodrigues da Silva (UFU); Eduardo Rodrigues Fregnani (Hospital Sírio-Libanês); e Veridiana Resende Novais Simamoto (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) Rafael Resende de Miranda.

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) examinadores(as), que passaram a arguir o (a) candidato (a). Após 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) APROVADO(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 10 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª. Dra. Gisele Rodrigues da Silva – UFU

Prof. Dr. Eduardo Rodrigues Fregnani
Hospital Sírio-Libanês

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

DEDICATÓRIA

A Deus,

Toda honra e toda glória a ti Senhor!
Obrigado pelo dom da vida, pelo teu infinito amor e bondade comigo em todos os momentos! Obrigado pela realização de mais esse sonho!

Aos meus pais, Agmar e Heleusa,

Aos quais agradeço pelo amor, apoio, carinho, educação, dedicação e tantos outros gestos que sempre dispensaram aos filhos.
Esta conquista também é de vocês! Amo vocês infinitamente!

À minha irmã, Viviane,

Que sempre me apoiou e me incentivou a prosseguir mesmo quando tudo parecia tão difícil. Muito obrigado pelo carinho, cumplicidade e companheirismo! Te amo!

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, em especial as minhas avós Arcedina e Cassimira pelo amor, pelas orações e pela torcida. Amo vocês!

À Prof^a. Dr^a. Veridiana Resende Novais Simamoto pela orientação, amizade, paciência, ensinamentos e compreensão das minhas limitações na realização deste trabalho. Conhecê-la melhor aumentou minha admiração por você não somente como professora, mas também como ser humano. Obrigado pelas conversas e pelo trato sempre tão gentil e prestativo.

Aos meus amigos de infância Alvaro Brandão, Moisés Junior, Paulo Ricardo, Victor Soares, Vagner Junior e William Marques, pela amizade de longa data e por sempre torcerem pelo meu sucesso, mesmo que a distância. Obrigado por todos os momentos vividos juntos e por serem tão especiais. Vocês são os melhores amigos que alguém poderia ter!

À Jessyca Figueira, Luiza Garcia e Jose Arthur, pelo convívio, amizade e por estarem juntos nos bons e nos maus momentos durante esses dois anos. Obrigado pelas conversas e por estarem sempre preocupados comigo.

Às amigas e pós-graduandas orientadas da Prof^a. Veridiana, Renata Borges, Camila Lopes, Fernanda Castelo e Nayara Ribeiro, pelas discussões, pelos ensinamentos no laboratório e nos equipamentos e, principalmente, pelo agradável convívio durante o mestrado. Foi ótimo trabalhar com vocês!

Aos alunos da graduação orientados da Prof^a. Veridiana, Allyne Carvalho, Giovanna Rizza, Letycia Lopes e Felipe Graça, obrigado pela amizade, pelo trabalho em grupo e pelo auxílio nas atividades laboratoriais deste trabalho. Obrigado Giovanna e Letycia por me permitirem realizar a co-orientação de vocês, levarei boas recordações e muito aprendizado.

Aos amigos da turma do mestrado, pela convivência, solidariedade, compreensão e pelos momentos que passamos juntos, que se tornarão saudosas lembranças. Desejo a cada um de vocês muito sucesso!

Às minhas amigas do mestrado Lais Schliebe e Stella Braga, muito obrigado pela companhia em todos os momentos, no laboratório aos finais de semana, no grupo do whatsapp e até em eventuais bares e baladas. Dividir com

você essa caminhada tornou-a mais leve e prazerosa. Vou sentir saudades da nossa convivência!

Aos meus companheiros de mestrado Ana Laura Rezende, Ede Lausson Arantes e Luiz Henrique Júnior, por todo apoio e momentos de descontração proporcionados. Obrigado por tornarem mais fácil e agradável essa etapa!

Aos professores da banca de qualificação, Prof. Carlos José Soares, Prof. Luís Henrique Araújo Raposo, Prof^a. Paula Dechichi, pelos conhecimentos e experiências transmitidos, pelo auxílio e críticas construtivas a este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Gisele Rodrigues da Silva, por todo apoio, dedicação e estímulo ao meu ingresso no mestrado. Obrigado por todas as oportunidades durante a graduação, você não se tornou apenas uma orientadora, mas também uma grande amiga.

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

Ao Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) do Instituto de Física (INFIS) da Universidade Federal de Uberlândia, na pessoa do Prof. Dr. Noelio Oliveira Dantas, por permitir a realização da espectroscopia Raman.

À Prof^a. Dr^a. Anielle Christine Almeida Silva do INFIS da Universidade Federal de Uberlândia, não tenho palavras para agradecer a dedicação, paciência e ajuda na realização das metodologias deste trabalho. Você foi fundamental para eu chegar até aqui, muito obrigado!

Aos técnicos do Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular (CPBio), Jonh Douglas e Eliete, obrigada pela disposição diariamente no laboratório e pela ajuda na execução do trabalho.

Ao pessoal do Programa de Cuidados Específicos à Doenças Estomatológicas (PROCEDE), Maria Auxiliadora, Célia Márcia, Keller Carvalho, Dhiancarlo Macedo, Cizelene Faleiros, Damilys Joelly, Edielly David, Fernanda Ladico, Cibelly Oliveira e Dalva, obrigado por todo o apoio e suporte durante

esse tempo que estive com vocês, a experiência foi incrível e somou muito à minha formação pessoal e profissional.

Aos funcionários da FOUFU, em especial à Camila, Daniele, Brenda, Graça, Adriane, Meirivone, Auxiliadora e Advaldo, muito obrigado pela amizade e ajuda sempre que precisei, todos sempre muito solícitos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (PPGO–UFU), pela oportunidade de cursar uma pós-graduação *stricto sensu* de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

A todos que torceram por mim e que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará
ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	15
2. PROPOSIÇÃO	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
RELEASE PARA IMPRENSA	44
ANEXOS	46

RESUMO

O conhecimento sobre a composição química da dentina é importante para compreender melhor os efeitos da radioterapia nos tecidos dentais duros. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da radioterapia *in vivo* sobre as propriedades químicas da dentina humana. Para isso, dois grupos foram utilizados (n=8), sendo um controle e um irradiado. Incisivos e caninos inferiores de pacientes não irradiados foram utilizados como grupo controle. Já os dentes do grupo irradiado foram obtidos de pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço, sendo que todos receberam uma dose de radiação fracionada de 1,8 Gy diários até o total de 72 Gy. Em ambos os grupos, os pacientes apresentavam doença periodontal avançada, indicando as exodontias. Os dentes foram seccionados de acordo com o tipo de dentina (coronária ou radicular), obtendo-se fatias perpendiculares ao eixo longitudinal do dente, da região cervical com 3 mm de espessura. Em seguida, essas fatias foram cortadas no sentido mesio-distal, obtendo-se duas metades. As metades linguais foram utilizadas para avaliação da composição química da dentina por meio das espectroscopias FTIR e Raman. Os parâmetros analisados foram: razão mineral/matriz (M:M), razão carbonato/mineral (C:M), razão amida I/amida III e razão amida I/CH₂. A partir da espectroscopia Raman, calculou-se também a cristalinidade do fosfato e do carbonato dentro da dentina. Os parâmetros químicos foram influenciados pela radiação e pelo tipo de dentina. FTIR revelou que a razão M:M apresentou diferença significativa para os dois fatores (radiação p=0,008; tipo de dentina p=0,043) e ainda que a dentina radicular apresentou menor razão C:M no grupo irradiado (p=0,003). Raman mostrou diferença significativa nas razões M:M e C:M apenas para o tipo de dentina (p=0,029 e p=0,031, respectivamente) e ainda revelou aumento da cristalinidade do fosfato e diminuição da cristalinidade do carbonato na dentina coronária do grupo irradiado (p=0,021 e p=0,039, respectivamente). Quanto à porção orgânica, o grupo controle apresentou razão amida I/amida III maior que o grupo irradiado em ambas metodologias (FTIR p=0,002, Raman p=0,017). Para a razão amida I/CH₂, a dentina radicular apresentou maior razão do que a coronária tanto no

FTIR quanto no Raman ($p < 0,001$). Dentro das limitações deste estudo, a radioterapia alterou a composição química da dentina humana, pois houve uma troca de íons fosfato-carbonato na hidroxiapatita e um aumento da concentração dos componentes orgânicos. Além disso, a dentina coronária mostrou ser mais mineralizada do que a radicular, que contém uma maior porção orgânica.

Palavras chave: Dentina, Neoplasias de cabeça e pescoço, Radioterapia, Espectroscopia Infravermelho Transformada de Fourier, Espectroscopia Raman.

ABSTRACT

Knowledge about the chemical composition of dentine is important to better understand the effects of radiotherapy on dental hard tissues. The aim of this study was to evaluate the effect of *in vivo* radiotherapy on the chemical properties of human dentine. For this, two groups were used (n=8), one control and one irradiated. Lower incisors and canines from non-irradiated patients were used as control group. On the other hand, the teeth of the irradiated group were obtained from head and neck radiotherapy patients subjected to fractionated X-ray radiation of 1.8 Gy daily until a total of 72 Gy. In both groups, the patients had advanced periodontal disease, indicating the teeth extraction. Teeth were sectioned according to the type of dentine (crown or root dentine), obtaining slices perpendicular to the longitudinal axis of the tooth, from the cervical region with 3 mm of thickness. Then, these slices were cut in the mesiodistal direction, obtaining two halves. Lingual halves were used to evaluate the chemical composition of dentine by FTIR and Raman spectroscopies. The analyzed parameters were: mineral/matrix ratio (M:M), carbonate/mineral ratio (C:M), amide I/amide III ratio and amide I/CH₂ ratio. Raman also calculated the phosphate and carbonate crystallinity. Chemical parameters were influenced by radiation and type of dentine. FTIR revealed that M:M ratio showed a significant difference for both factors (radiation p=0.008; type of dentine p=0.043), and the root dentine presented a lower C:M ratio in the irradiated group (p=0.003). Raman showed significant difference in M:M and C:M ratios only for type of dentine (p=0.029 and p=0.031, respectively) and also revealed an increase in phosphate crystallinity and a decrease in carbonate crystallinity in crown dentine for irradiated group (p=0.021 and p=0.039, respectively). For organic portion, the control group had a greater amide I/amide III ratio than the irradiated in both methodologies (FTIR p=0.002, Raman p=0.017). For amide I/CH₂ ratio, the root dentine showed a greater ratio than the crown dentine in both methods (p<0.001). Within the limitations of this study, radiotherapy altered the chemical composition of human dentine, as there was an exchange of phosphate-carbonate ions in the hydroxyapatite and an increase in the concentration of the organic components.

In addition, crown dentine showed to be more mineralized than the root dentine, which contains a greater organic portion.

Keywords: Dentine, Head and neck cancer, Radiotherapy, Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

A incidência e prevalência do câncer têm aumentado drasticamente nas últimas décadas (Ferlay et al., 2015). No Brasil, a estimativa de novos casos de câncer para 2016/2017 é de aproximadamente 600 mil (INCA, 2015). Dentre os tipos de câncer, o de cabeça e pescoço é o sexto mais comum em todo o mundo, com uma incidência global de 630 mil novos casos por ano (Vigneswaran & Williams, 2014). O tratamento deste tipo de neoplasia envolve radioterapia, quimioterapia, cirurgia ou uma combinação destas modalidades (Jawad et al., 2015).

A radioterapia é uma modalidade terapêutica rotineiramente prescrita para tratar pacientes diagnosticados com câncer oral (Jawad et al., 2015). Ela é feita utilizando radiações ionizantes que carregam energia ao interagirem com os tecidos dando origem a elétrons rápidos que ionizam o meio e criam efeitos químicos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA. Durante o processo de ionização os átomos são alterados, o que pode provocar também alteração das estruturas das moléculas que os contém. Assim, se a energia de excitação ultrapassar a energia de ligação entre os átomos pode ocorrer a quebra das ligações químicas e consequentemente alterações moleculares (INCA, 2015). A unidade empregada para medir a quantidade de radiação é o Gray (Gy), que informa a dose de radiação absorvida por qualquer material ou tecido humano. Quando a dose de radiação é elevada (altos valores de Gy), muitas células que estão recebendo essa radiação podem não suportar as alterações e morrem após tentativas de se dividir. As radiações ionizantes são capazes de induzir danos em diversas profundidades no organismo humano e, com isso, causar a morte celular. Por esse motivo utiliza-se tratamentos com radiação para a terapia oncológica (INCA, 2015).

Entretanto, além de destruir as células tumorais, a radioterapia também é capaz de causar alguns danos aos tecidos saudáveis localizados no campo da radiação (Vissink et al., 2003; Tolentino et al., 2011; Jawad et al., 2015). Pacientes que fazem radioterapia na região de cabeça e pescoço podem ter vários efeitos adversos na cavidade oral como mucosite, disfagia, disgeusia,

infecções por cândida, trismo, xerostomia, osteorradionecrose e cáries relacionadas à radiação (Tolentino et al., 2011; Jawad et al., 2015).

Essas lesões conhecidas como cáries relacionadas à radiação se diferem na localização e na forma de progressão quando comparadas às cáries convencionais. A cárie relacionada à radiação ocorre de forma a circundar a área cervical dos dentes, o que leva a crer que esta área é mais susceptível (Walker et al., 2011). Pode-se notar alterações na translucidez e na cor, através da pigmentação marrom das superfícies cervicais do esmalte e da dentina e um aumento da friabilidade, com consequente perda de estrutura dentária na mesma região (Kielbassa et al., 1997; Kielbassa et al., 1999; Kielbassa et al., 2006). A delaminação patológica do esmalte da dentina é um padrão único de destruição observado clinicamente após a radioterapia oral (McGuire et al., 2014). Especula-se que a mudança induzida pela radiação na estrutura colágena poderia potencialmente impactar a estabilidade da junção amelodentinária levando a delaminação do esmalte após o tratamento (Reed et al., 2015).

Além disso, a literatura fornece evidências de efeitos diretos da radiação sobre a estrutura dentária, que incluem alterações morfológicas na estrutura dentária, na junção amelodentinária, na solubilidade ácida do esmalte e na microdureza dos tecidos dentais duros (Al-Nawas et al., 2000; Kielbassa et al., 2006; Silva et al., 2009; Soares et al., 2011; Gonçalves et al., 2014; Qing et al., 2015; Reed et al., 2015; Novais et al., 2016; Qing et al., 2016). Os dentes submetidos à irradiação teriam uma atrofia dos processos odontoblásticos e uma obliteração dos túbulos dentinários, como resultado do dano celular causado pela irradiação. Isto ocasionaria impedimento da vascularização e do metabolismo, particularmente, na área das terminações dos processos odontoblásticos (Grötz et al., 1997). Há também uma desmineralização em áreas subsuperficiais de dentes de pacientes submetidos à radioterapia, caracterizada pela perda total da estrutura prismática. Ocorrem diferenças micromorfométricas significantes no processo de desmineralização do esmalte de dentes submetidos à irradiação, o qual se torna menos resistente ao ataque ácido (Grötz et al., 1998).

Frente à radiação, a integridade e as propriedades mecânicas do esmalte são afetadas e alterações na junção cimento-esmalte (JCE) são percebidas, explicando os sinais clínicos de destruição completa de áreas dessa junção (Al-Nawas et al., 2000). Vários outros estudos relataram alterações físicas e químicas em dentes após o tratamento radioterápico, ocasionando modificações das propriedades mecânicas como redução da microdureza superficial, resistência à tração e resistência à fratura (Kielbassa et al., 1997; Fränzel et al., 2006; Soares et al., 2010). Essas alterações resultam em enfraquecimento e destruição dos dentes (Fränzel et al., 2006; Soares et al., 2010). A radiação ocasionaria uma redução da dureza e elasticidade do esmalte e da dentina devido à descarboxilação de ligações laterais e perda de grupos acídicos de fosfato, o que causa uma redução da interação mineral-orgânica dos tecidos dentais (Fränzel et al., 2006).

Uma grande quantidade de mudanças e danos em todos os tecidos do elemento dentário é encontrada após a radioterapia. Há uma redução da interação entre os componentes orgânicos e os cristais de hidroxiapatita do esmalte e da dentina, o que também justifica a fragilidade do dente frente ao acometimento das cáries de irradiação (Lieshout & Bots, 2014). Além disso, a medida que se aumenta a dose de irradiação, há também o aumento das alterações morfológicas na região interprismática do esmalte, enquanto que na dentina há uma fragmentação das fibras colágenas, acompanhada pela presença de fissuras e obliteração dos túbulos dentinários (Gonçalves et al., 2014). O dano também pode ocorrer em dentes decíduos quando irradiados, alterando a microdureza do esmalte e da dentina, em função da dose e da região irradiada e originando uma perturbação morfológica em ambos, que passam a apresentar uma superfície amorfa que complica a identificação dos prismas e dos túbulos dentinários (Mellara et al., 2014).

Quanto ao efeito da radioterapia sobre o colágeno, McGuire et al. (2014) demonstraram que a imunorreatividade do colágeno tipo IV dentro da matriz orgânica do esmalte foi reduzida após doses elevadas de radiação *in vivo*. Assim, a perda de colágeno tipo IV em dentes submetidos à radioterapia pode representar um mecanismo de instabilidade da junção amelodentinária,

aumentando a incidência de delaminação do esmalte e repartição do elemento dental.

Dessa forma, o conhecimento sobre a composição química da dentina é importante para melhor compreender os efeitos da radioterapia sobre os tecidos dentais duros. A dentina é um tecido de origem mesenquimal, constitui o corpo do dente e tem como funções principais proteger a polpa e dar suporte para o esmalte sobrejacente. A dentina madura é composta de aproximadamente 70% mineral, 20% matriz orgânica e 10% de água. Seu componente inorgânico consiste em hidroxiapatita e a parte orgânica é fundamentalmente colágeno, que proporciona a resiliência necessária para a coroa suportar o ato mastigatório. As estruturas organizacionais da dentina são os túbulos dentinários, que abrigam os prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos e são responsáveis pela transmissão dos estímulos (Avery, 2005; Nanci, 2013). Assim, por apresentar um maior teor de água a dentina pode ser mais vulnerável aos efeitos da radiação do que o esmalte (Gonçalves et al., 2014), pois a radiação pode afetar as moléculas de água nela presentes, formando radicais livres reativos, como oxigênio e peróxido de hidrogênio, que pode interagir com biomoléculas e causar danos celulares (Fang et al., 2002). Este processo pode causar desnaturação dos componentes orgânicos das estruturas dentárias (Pioch et al., 1992).

A restauração de dentes em pacientes que foram submetidos à radioterapia cervicofacial pode ser extremamente desgastante para pacientes e odontólogos (Pow et al., 2003; Vissink et al., 2003). Existe uma ineficiência da adesão entre a restauração e o substrato dentinário de dentes irradiados, principalmente após altas doses de irradiação (Naves et al., 2012). Esse processo de adesão de materiais restauradores ao esmalte e à dentina ocorre por mecanismo básico no qual há um processo de troca, que envolve a substituição dos minerais removidos dos tecidos dentais, por monômeros resinosos, que se infiltram e são polimerizados nas porosidades criadas, promovendo adesão micromecânica (Conceição, 2007). Em casos de reabilitações orais de pacientes submetidos à radioterapia, esse processo de adesão pode ser comprometido devido às alterações estruturais na rede de

colágeno da dentina (Cheung et al., 1990; Kielbassa et al., 1999). O momento da restauração (previamente ou após a radioterapia) apresenta-se como fator determinante na resistência de união da dentina e esmalte irradiado com o material restaurador, sendo o resultado melhor quando a restauração é realizada previamente à irradiação (Naves et al., 2012; Yadav & Yadav, 2013).

No entanto, a maioria dos estudos que investigam a influência da radioterapia nos tecidos dentais é baseada em protocolos de radiação *in vitro*, muitas vezes utilizando modelos que não reproduzem fielmente o ambiente oral de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Há uma redução da função salivar nesses pacientes, proporcionando condições de umidade bucal bastante reduzidas (Tolentino et al., 2011; Jawad et al., 2015; Marmary et al., 2016). Assim, torna-se importante investigar os efeitos da radioterapia *in vivo* sobre as propriedades químicas das estruturas dentárias. A hipótese nula deste estudo foi de que a radiação *in vivo* não alteraria a composição química da dentina humana, independentemente da sua localização.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da radioterapia *in vivo* sobre as propriedades químicas da dentina coronária e radicular, por meio de análises por Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia Raman.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Delineamento experimental

1. Unidade experimental: Incisivos e caninos inferiores.
2. Fator em estudo: Irradiação em dois níveis (dentina não irradiada e dentina irradiada *in vivo*); Tipo de dentina (coronária e radicular).
3. Variável resposta: Composição química da dentina (Razão mineral/matriz (M:M), razão carbonato/mineral (C:M), razão amida I/amida III, razão amida I/CH₂, cristalinidade).

4. Método de análise: Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR); Espectroscopia Raman.
5. Método estatístico: Análise de variância (ANOVA) em dois fatores, considerando os fatores irradiação e tipo de dentina, seguido do teste de comparação de médias (Teste de Tukey).

3.2 - Obtenção, armazenamento e preparo das amostras

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo nº 50329715.6.0000.5152), incisivos e caninos inferiores foram coletados após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pacientes e armazenados em água deionizada a uma temperatura de 4°C. Antes dos testes, 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 tipo 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 para profilaxia. Os dentes foram examinados sob microscópio estereoscópico (Leica MS5, Leica Microscopy Systems Ltd, Heerbrugg, Suíça) para evidenciar cáries e outros defeitos estruturais. Assim, eles foram agrupados da seguinte forma: A) Grupo controle: incisivos e caninos inferiores (n=8) de pacientes não irradiados (idade média de 55 anos) extraídos devido a doença periodontal (Figura 1A); B) Grupo irradiado: incisivos e caninos inferiores (n=8) extraídos de pacientes que fizeram radioterapia na região de cabeça e pescoço (idade média de 59 anos) e submetidos a radiação a partir de um acelerador linear com doses fracionadas em 1,8 Gy diários, até o total de 72 Gy (Figura 1B). Esses pacientes apresentavam tumores localizados na língua, rebordo alveolar inferior e orofaringe. Todos os dentes incluídos neste grupo estavam localizados dentro do campo de radiação. Devido a doença periodontal, esses dentes foram extraídos $41,5 \pm 19,2$ meses após o término da radioterapia no Programa de Cuidados Específicos a Doenças Estomatológicas (PROCEDE), do Hospital Odontológico da Universidade Federal de Uberlândia (HO-UFU).

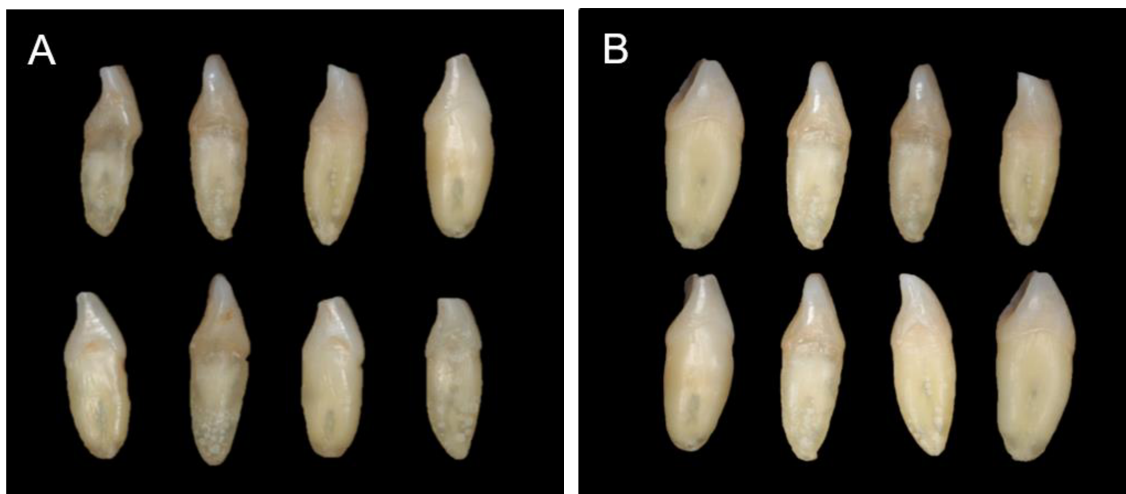


Figura 1. Dentes selecionados para o estudo: A) Dentes do grupo controle; B) Dentes do grupo irradiado

Dentro dos grupos, cada dente foi seccionado e dividido em dois subgrupos ($n=8$) de acordo com o tipo de dentina: coronária e radicular (Figura 2). Dessa forma, os dentes foram inicialmente fixados em placa de acrílico com cera pegajosa em bastões (Kerr Corporation, CA, EUA) e seccionados com disco diamantado de dupla face (Isomet, série 15HC diamante; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) montado em cortadeira de precisão (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob refrigeração, na altura da junção amelocementária, perpendicularmente ao longo eixo dos dentes (Figura 3). Cada coroa foi seccionada em três fatias de 3 mm (oclusal, média e cervical). A fatia cervical foi utilizada para o estudo e teve seu esmalte seccionado para obter apenas amostra de dentina. A face superior da amostra foi utilizada para representar a dentina coronária. As raízes também foram seccionadas em três terços (3 mm) e a superfície inferior da fatia cervical foi utilizada para análise da composição química da dentina radicular (Figura 4).

Em seguida, todas as fatias cervicais foram seccionadas no sentido méso-distal, resultando em duas hemisseções, que correspondem à metade vestibular e à metade lingual. As metades linguais foram utilizadas para as análises no FTIR e Raman (Figura 4). Para manter todas as mensurações no mesmo local, o lado oposto da superfície testada foi marcado com uma camada

de verniz ácido resistente (esmalte para unha, Risqué®, Barueri, SP, Brasil). Após o preparo, as amostras foram armazenadas em tubos de eppendorf com água deionizada a 4°C até a realização das metodologias.

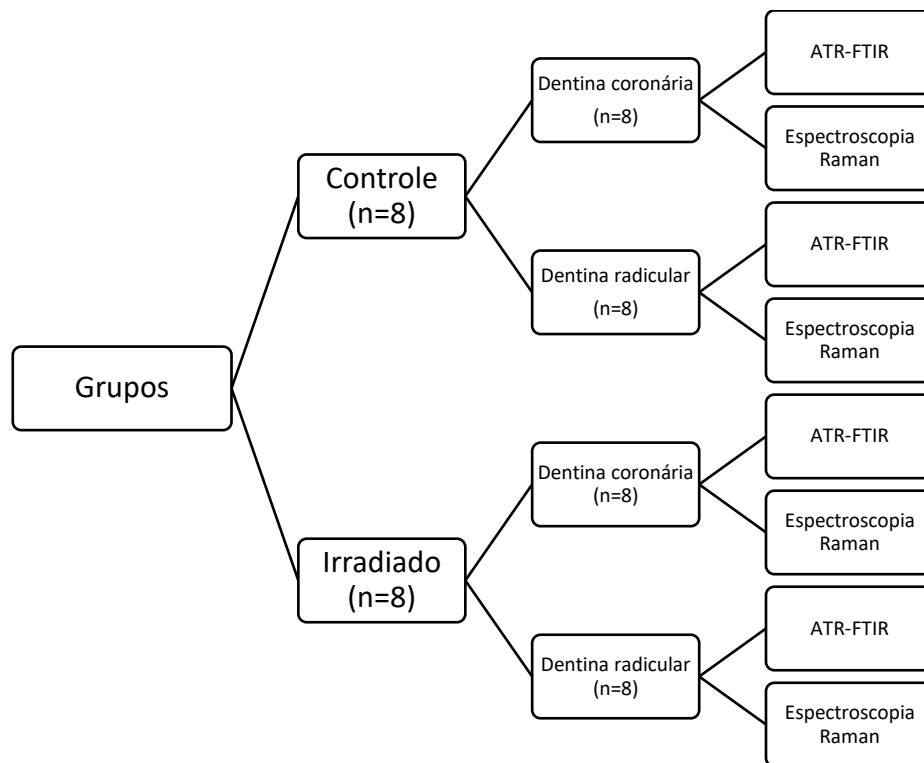


Figura 2. Organograma dos grupos experimentais deste estudo.

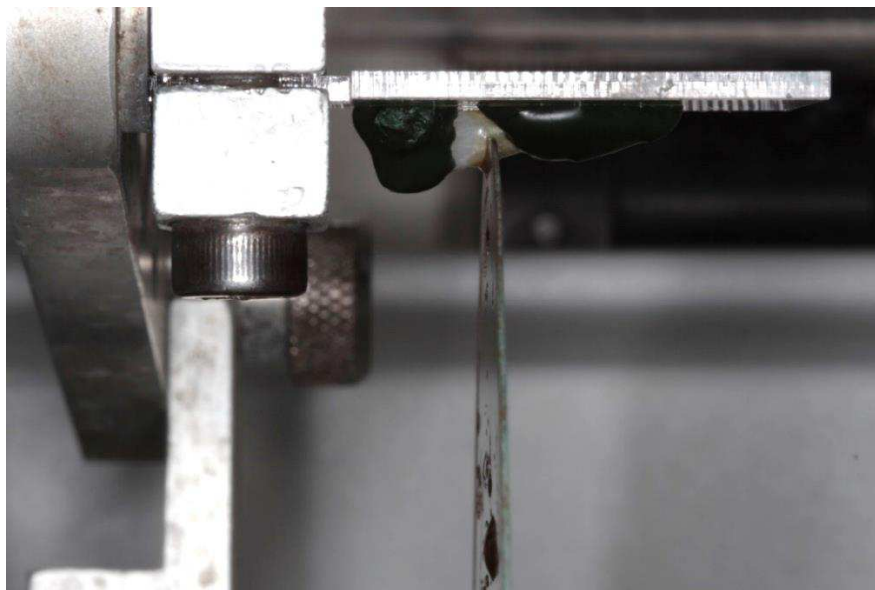


Figura 3. Amostra dental sendo seccionada em cortadeira de precisão, perpendicularmente ao longo eixo do dente.

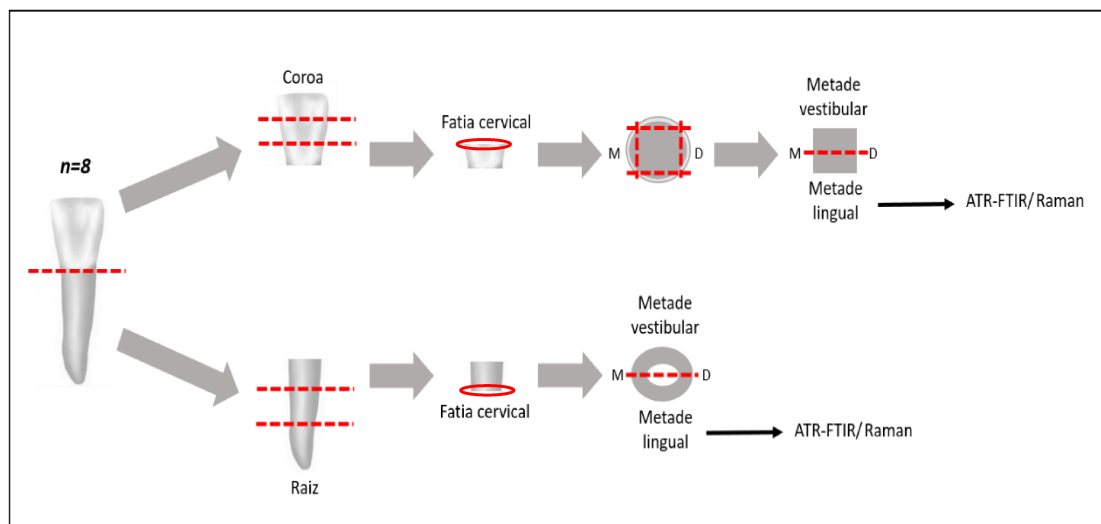


Figura 4. Esquema ilustrativo do preparo das amostras.

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

A composição química das amostras de dentina foi determinada utilizando Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (Vertex 70, Bruker, Ettlingen, Alemanha) por meio da técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR) (Figura 5). 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 da amostra com o cristal do equipamento (Figura 6). Em seguida, os espectros foram registrados no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} . Cada amostra foi escaneada 32 vezes e o espectro final obtido foi a média de todas essas leituras. Os espectros foram registrados e analisados com o *software* OPUS 6,5 (Bruker, Ettlingen, Alemanha) (Figura 7). Após correção da linha de base e normalização pela banda do fosfato (702-1190 cm^{-1}) dos espectros, os seguintes parâmetros químicos foram analisados: (1) Razão mineral/matriz (M:M), dada pela razão entre as bandas em 1035 e 1655 cm^{-1} , atribuídas à vibração ν_3 do íon fosfato e ao alongamento C=O da amida I no colágeno, respectivamente; (2) Razão carbonato/mineral (C:M), dada pela relação das áreas integradas do carbonato ν_2 a 872 cm^{-1} para o fosfato ν_3 a 1035 cm^{-1} ; (3) Razão amida I/amida III, indicada pela relação das áreas integradas da amida I a 1655 cm^{-1} para a amida III a 1235 cm^{-1} ; (4) Razão amida I/ CH_2 , que é

representada pela relação das áreas integradas da amida I a 1655 cm^{-1} para o balanço do grupo CH_2 a 1450 cm^{-1} (Jiang et al., 2007; Liu et al., 2014).



Figura 5. Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier, com dispositivo ATR (Vertex 70, Bruker).

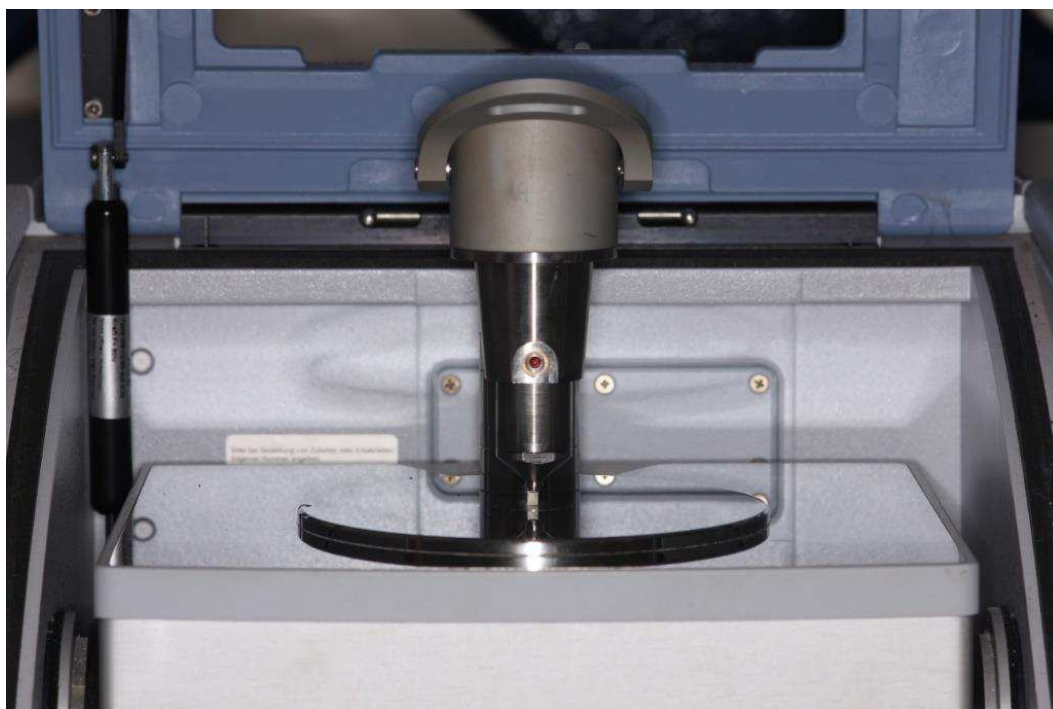


Figura 6. Amostra posicionada sobre o cristal do equipamento para leitura.

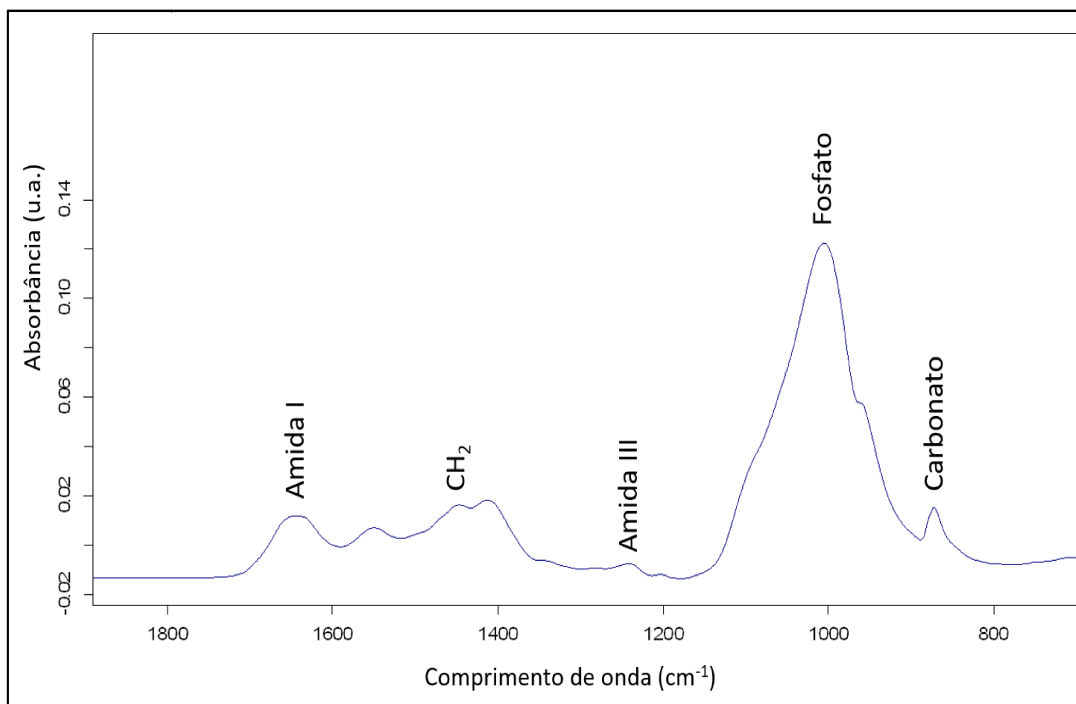


Figura 7. Exemplo de espectro obtido por meio do *software* OPUS 6,5 para a dentina coronária do grupo controle.

3.4 - Espectroscopia Raman

Para a realização desta metodologia, utilizou-se um Espectrômetro LabRam HR Evolution Raman (Horiba LabRam, Villeneuve d'Ascq, França), localizado no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) do Instituto de Física (INFIS) da Universidade Federal de Uberlândia (Figura 8). O equipamento operou numa potência de excitação de 20 mW com radiação emitida por um laser He-Ne (linha de excitação de 632,8 nm). Os espectros Raman foram obtidos utilizando uma rede de 600 linhas/mm centrada no intervalo de 300 a 3100 cm^{-1} . Usando a mesma superfície analisada no FTIR, cinco espectros foram obtidos em cada amostra dos dois grupos. Um monitor de alta resolução permitiu a identificação visual da posição exata na qual os espectros Raman foram coletados sob uma objetiva de 100x (Figura 9).

O *software* OriginPro 7,5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA) foi utilizado para analisar os dados adquiridos na espectroscopia Raman. Os espectros foram ajustados por correção da linha de base de múltiplos pontos e o pico de vibração ν_1 do fosfato a 960 cm^{-1} foi selecionado como padrão interno

para normalização. O pico a 1070 cm^{-1} foi atribuído à vibração ν_1 do grupo carbonato e o pico a 960 cm^{-1} à vibração ν_1 do grupo fosfato na hidroxiapatita. Os picos em $1246/1270$, 1450 e $1655/1667\text{ cm}^{-1}$ correspondem à amida III, CH_2 e amida I, respectivamente, e foram utilizados para identificar a conformação molecular das cadeias polipeptídicas (Jastrzebska et al., 2003; Xu & Wang, 2011) (Figura 10).

Com base nos dados espectrais Raman, calculou-se a proporção do fosfato ν_1 para amida I para analisar as diferenças na razão mineral/matriz (M:M) das amostras. Para analisar as diferenças na composição mineral (C:M), utilizou-se a razão do carbonato a 1.070 cm^{-1} para o fosfato a 960 cm^{-1} . Além disso, as larguras das bandas de fosfato a 960 cm^{-1} e de carbonato a 1.070 cm^{-1} , dadas pela largura à meia altura (FWHM), foram obtidas em cada espectro para representar o grau de cristalinidade dentro da dentina (Pucéat et al., 2004; Toledano et al., 2015; Reed et al., 2015). Para determinar a natureza do colágeno nas amostras, as seguintes razões foram calculadas: (1) amida I/amida III que diz respeito à organização do colágeno; e (2) amida I/ CH_2 que indica alteração na qualidade do colágeno (Salehi et al., 2013; Toledano et al., 2015).



Figura 8. Espectrômetro Raman (LabRam HR Evolution Raman, Horiba).

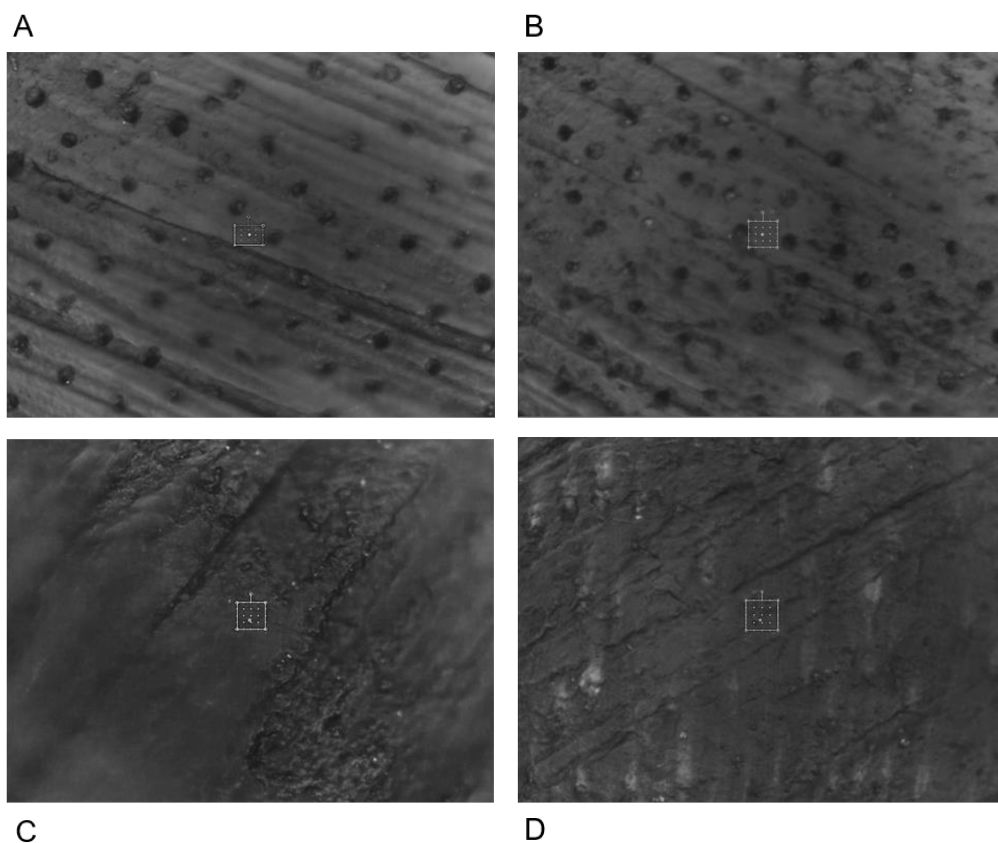


Figura 9. Superfície das amostras através de uma objetiva de 100x – A) Dentina coronária do grupo controle; B) Dentina coronária do grupo irradiado; C) Dentina radicular do grupo controle; D) Dentina radicular do grupo irradiado.

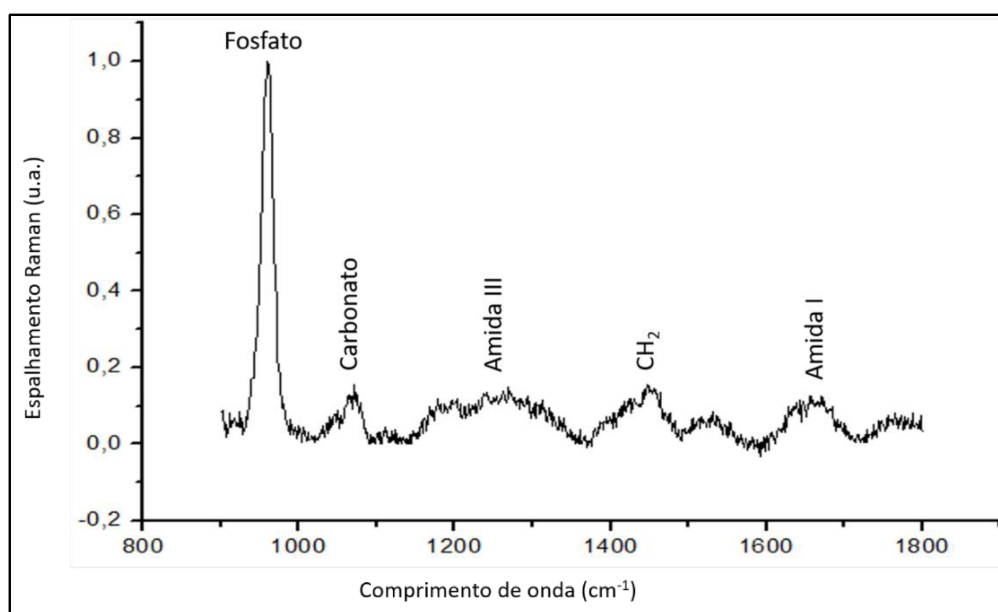


Figura 10. Exemplo de espectro Raman obtido com o *software* OriginPro 7,5 para a dentina coronária do grupo controle.

3.5 - Análise estatística

Os dados foram testados para distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p>0,05$) e igualdade de variância (teste de Levene, $p>0,05$). As razões obtidas no FTIR e no Raman foram analisadas com Análise de variância em dois fatores (ANOVA), considerando os fatores irradiação e tipo de dentina, seguido do teste de Tukey. Para a análise utilizou-se o pacote estatístico Sigma Plot (versão 12.0, Systat Software, Inc., San José, CA, EUA) e considerou-se que um valor de p inferior a 0,05 era estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 – FTIR

As médias e desvio padrão para os parâmetros químicos obtidos no FTIR são mostrados nas Tabelas 1, 2 e 3. O grupo irradiado apresentou menores valores de carbonato e maiores valores de amida I, III e CH_2 quando comparado ao grupo controle. A dentina radicular também apresentou maiores valores para amida I, III e CH_2 do que a dentina coronária, independentemente da irradiação. Para a razão M:M, 2-way ANOVA mostrou que os fatores irradiação ($p=0,008$) e tipo de dentina ($p=0,043$) foram estatisticamente significantes. Tukey revelou que a razão M: M é maior para o grupo controle e para a dentina coronária. Já para a relação C:M, o tipo de dentina e a interação entre os fatores em estudo foram significativos ($p=0,027$ e $p=0,003$, respectivamente). Tukey demonstrou que dentro do grupo irradiado, a dentina coronária apresenta maior razão C:M, e ainda, que a dentina radicular do grupo controle apresenta esta razão maior do que a radicular do grupo irradiado. A razão amida I/amida III mostrou diferença significativa apenas para o fator irradiação ($p=0,002$), sendo que o grupo controle apresentou maiores valores do que o grupo irradiado. Para a razão amida I/ CH_2 , ambos os fatores e a interação entre eles foram significantes ($p<0,001$; $p<0,001$ e $p=0,016$, respectivamente). A dentina radicular apresentou maior razão amida I/ CH_2 que a dentina coronária, independentemente do fator irradiação. E a dentina radicular do grupo controle também apresentou esta razão maior do que a radicular do grupo irradiado.

Tabela 1 - Médias das áreas integradas de cada componente químico analisado no FTIR.

		<i>Fosfato</i>	<i>Carbonato</i>	<i>Amida I</i>	<i>Amida III</i>	<i>CH₂</i>
Controle	<i>Dentina coronária</i>	13,060	0,290	1,246	0,170	0,119
	<i>Dentina radicular</i>	13,540	0,301	1,460	0,224	0,123
Irradiado	<i>Dentina coronária</i>	13,429	0,281	1,611	0,283	0,185
	<i>Dentina radicular</i>	13,281	0,285	1,751	0,335	0,189

Tabela 2 - Média e desvio padrão das razões M:M e C:M para os grupos experimentais no FTIR.

	Razão M:M		Razão C:M	
	<i>Controle</i>	<i>Irradiado</i>	<i>Controle</i>	<i>Irradiado</i>
<i>Dentina coronária</i>	12,16 (1,42) Aa	9,39 (2,34) Ab	0,021 (0,002) Aa	0,023 (0,002) Aa
<i>Dentina radicular</i>	9,97 (1,92) Ba	7,99 (2,89) Bb	0,022 (0,001) Aa	0,019 (0,002) Bb

*Diferentes letras maiúsculas (análise em colunas) e letras minúsculas (análise em linhas) representam diferenças significativas (p<0,05).

Tabela 3 - Média e desvio padrão das razões Amida I/Amida III e Amida I/CH₂ para os grupos experimentais no FTIR.

	Razão Amida I/Amida III		Razão Amida I/CH ₂	
	Controle	Irradiado	Controle	Irradiado
<i>Dentina coronária</i>	6,49 (0,13) Aa	5,51 (0,80) Ab	9,45 (1,66) Ba	8,84 (0,88) Ba
<i>Dentina radicular</i>	6,31 (0,40) Aa	5,61 (0,60) Ab	14,21 (0,48) Aa	11,12 (1,92) Ab

*Diferentes letras maiúsculas (análise em colunas) e letras minúsculas (análise em linhas) representam diferenças significativas (p<0,05).

4.2 – Raman

As médias e o desvio padrão para os parâmetros químicos obtidos na espectroscopia Raman são mostrados nas Tabelas 4, 5 e 6. O grupo irradiado apresentou maiores valores de amida I, III e CH₂ quando comparado ao grupo controle. A dentina radicular também apresentou maiores valores de carbonato e amida I do que a dentina coronária, independentemente da irradiação. Para as razões M:M e C:M, 2-way ANOVA mostrou diferença significativa somente para o tipo de dentina (p=0,029 e p=0,031, respectivamente). Tukey revelou que a dentina coronária apresentou maiores razões do que a dentina radicular em ambos os grupos. Para a cristalinidade do fosfato, o tipo de dentina e a interação entre os fatores em estudo foram significativos (p<0,001 e p=0,021, respectivamente). Os valores da cristalinidade do fosfato na dentina coronária do grupo controle foi menor do que do grupo irradiado e ainda, dentro do grupo controle, a dentina coronária apresentou uma cristalinidade menor do que a radicular. Quanto à cristalinidade do carbonato, apenas a interação entre os fatores em estudo foi significativa (p=0,039). A cristalinidade do carbonato na dentina coronária do grupo controle foi maior do que do grupo irradiado e ainda, dentro do grupo irradiado, a dentina coronária apresentou menor cristalinidade do que a radicular. Para as razões orgânicas, a razão amida I/amida III mostrou que os fatores irradiação (p=0,017) e tipo de dentina (p = 0,008) foram

estatisticamente significantes. O grupo controle apresentou maior razão amida I/amida III do que o grupo irradiado e, ainda, a dentina radicular apresentou maior razão do que a dentina coronária em ambos os grupos. Para a razão amida I/CH₂, ambos os fatores também foram significantes (irradiação p=0,037; tipo de dentina p<0,001). O grupo controle apresentou maior razão amida I/CH₂ do que o irradiado e também a dentina radicular apresentou essa razão maior do que a dentina coronária nos dois grupos.

Tabela 4 - Médias das áreas integradas de cada componente químico analisado no Raman.

		Fosfato	Carbonato	Amida I	Amida III	CH₂
Controle	<i>Dentina coronária</i>	0,999	0,112	0,112	0,094	0,113
	<i>Dentina radicular</i>	0,999	0,117	0,121	0,085	0,106
Irradiado	<i>Dentina coronária</i>	0,996	0,114	0,119	0,117	0,115
	<i>Dentina radicular</i>	0,999	0,119	0,128	0,098	0,110

Tabela 5 - Média e desvio padrão de M:M, C:M, cristalinidade das bandas de fosfato e carbonato para os grupos experimentais no Raman.

	Razão M:M		Razão C:M		Cristalinidade da banda de fosfato		Cristalinidade da banda de carbonato	
	Controle	Irradiado	Controle	Irradiado	Controle	Irradiado	Controle	Irradiado
<i>Dentina coronária</i>	9,62 (1,62) Aa	8,80 (2,15) Aa	0,119 (0,007) Aa	0,120 (0,005) Aa	7,16 (0,21) Bb	7,43 (0,29) Aa	8,96 (0,43) Aa	8,32 (0,35) Bb
<i>Dentina radicular</i>	8,05 (1,18) Ba	7,87 (0,94) Ba	0,111 (0,007) Ba	0,117 (0,009) Ba	7,71 (0,19) Aa	7,58 (0,23) Aa	8,90 (0,36) Aa	9,00 (0,69) Aa

*Diferentes letras maiúsculas (análise em colunas) e letras minúsculas (análise em linhas) representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Média e desvio padrão das razões Amida I/Amida III e Amida I/CH₂ para os grupos experimentais em espectroscopia Raman.

	Razão Amida I/Amida III		Razão Amida I/CH ₂	
	Controle	Irradiado	Controle	Irradiado
<i>Dentina coronária</i>	1,14 (0,22) Ba	0,95 (0,18) Bb	0,92 (0,20) Ba	0,89 (0,11) Bb
<i>Dentina radicular</i>	1,37 (0,27) Aa	1,17 (0,21) Ab	1,23 (0,21) Aa	1,04 (0,13) Ab

*Diferentes letras maiúsculas (análise em colunas) e letras minúsculas (análise em linhas) representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A hipótese nula foi rejeitada, uma vez que a irradiação *in vivo* foi capaz de alterar a composição química da dentina. Isto provavelmente ocorre porque há uma interação da radiação com os componentes químicos da estrutura dentária, sendo capaz de alterar sua conformação molecular.

As metodologias utilizadas neste estudo fornecem informações sobre a composição química da dentina e são métodos não destrutivos, permitindo o uso da mesma amostra para diferentes avaliações (Bistey et al., 2007). A espectroscopia FTIR é a medida do comprimento de onda e da intensidade da absorção de luz infravermelha por uma amostra. A luz infravermelha é energética o suficiente para excitar vibrações moleculares a níveis de energia mais elevados (Cui et al., 2012). Assim como na espectroscopia no infravermelho, a espectroscopia Raman fornece informações sobre níveis de energia vibracionais e sobre a estrutura molecular, porém os processos físicos envolvidos são diferentes. A espectroscopia de infravermelho é baseada em efeitos de absorção de luz, enquanto a espectroscopia Raman é governada por processos de espalhamento de luz por matéria (Zieba-Palus et al., 2006; Qing et al., 2016). Portanto, pode-se dizer que a realização de ambas metodologias para uma compreensão e análise química mais aprofundada de uma amostra se torna importante, na medida que são técnicas complementares, uma vez que abrangem diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético.

Para a execução deste estudo, optou-se pelo uso de dentes irradiados *in vivo*, com o intuito de verificar a influência da radiação sobre as estruturas dentárias associada a fatores relacionados ao ambiente oral de pacientes com câncer de cabeça e pescoço durante a radioterapia, como pH, xerostomia e dieta (Lieshout & Bots, 2014; Jawad et al., 2015). Todos os dentes selecionados estavam localizados dentro do campo de radiação, sendo que todos os pacientes receberam 72 Gy no total, fraccionados em 1,8 Gy diários. A partir de 30 Gy o dano à estrutura dentária já é irreversível, sendo que a medida em que se aumenta a dose de radiação, aumenta-se também as sequelas orais do tratamento do câncer (Gonçalves et al., 2014; Mellara et al., 2014; Liang et al.,

2016). Para obter uma uniformidade dos dados, padronizou-se também a idade dos pacientes nos dois grupos (de 50 a 60 anos), visto que diferentes idades podem apresentar diferenças microestruturais e de composição na dentina (Duke & Lindemuth, 1991; Reed et al., 2015).

Como meio de armazenamento das amostras utilizou-se água deionizada, uma vez que as metodologias propostas avaliaram a composição química das amostras e, dependendo do tipo de solução de armazenamento, novos íons e componentes químicos poderiam ser incorporados às amostras. A água deionizada parece ser o melhor meio de armazenamento para pesquisas com espectroscopias FTIR e Raman, já que ela passa por um processo de purificação no qual é feita a remoção total de íons presentes na água e elimina-se minerais, metais e outros contaminantes (Jiang et al., 2007; Ferreira et al., 2016). Além disso, estudos anteriores também indicaram que a matriz orgânica da dentina pode permanecer química e mecanicamente estável, mesmo após longos períodos de armazenagem em água (Carvalho et al., 2000; Carrilho et al., 2005).

Avaliando a porção inorgânica da dentina, a radiação gera efeitos diferentes nas bandas de fosfato e carbonato. A cristalinidade dessas bandas representa a percentagem de material cristalino, que se correlaciona com a organização no interior dos cristais (Reyes-Gasga et al., 2013). A diminuição da cristalinidade do carbonato nos dentes irradiados pode ser explicada por um maior número de íons planares de carbonato substituindo os íons tetraédricos de fosfato na estrutura da hidroxiapatita, aumentando o distúrbio da estrutura cristalina (Featherstone & Lussi, 2006; Leventouri et al., 2009; Shellis et al., 2014). Dois tipos de substituição podem ocorrer, tipo A e tipo B, em que o primeiro é designado pelos íons carbonato substituindo as posições dos hidróxidos enquanto que o último quando o carbonato ocupa as posições dos íons fosfato (Rey et al., 1989; Liu et al., 2014). Essa substituição causa deformações na rede cristalina e resulta em fases menos estáveis e mais solúveis em ácido (Liu & Hsu, 2007), o que poderia tornar os dentes mais suscetíveis à cárie. Além disso, dentro do grupo irradiado, a cristalinidade do carbonato foi maior na dentina radicular do que na coronária, uma vez que a

dentina radicular não recebe a radiação diretamente pois está localizada dentro do osso alveolar, o que funciona como uma proteção biológica para este tecido (Soares et al., 2010; Novais et al., 2016).

Estudos prévios afirmam que a radioterapia altera a matriz orgânica da dentina (Açil et al., 2007; Soares et al., 2010; Lieshout & Bots, 2014; McGuire et al., 2014), o que corroboram com os achados do presente estudo. Houve um aumento da amida I após a irradiação. A amida I é a banda de absorção mais intensa nas proteínas e é regida primariamente pelas vibrações de estiramento dos grupos C=O (70-85%) e C-N (10-20%). A posição exata da banda é determinada pela conformação do esqueleto e pelo padrão de ligação do hidrogênio (Xu & Wang, 2012). Em ambos os métodos, a razão amida I/amida III tiveram alterações frente à radiação, o que evidencia uma alteração na organização do colágeno da dentina (Toledano et al., 2015). A amida III é uma banda muito instável e complexa que depende dos detalhes do campo de força, da natureza das cadeias laterais e da ligação de hidrogênio (Xu & Wang, 2012). Já as alterações na razão amida I/CH₂ indicam uma qualidade de colágeno alterada (Salehi et al., 2013; Toledano et al., 2015). Como o colágeno é a proteína mais abundante da dentina (90%), sua proteólise tem um impacto mais significativo na integridade estrutural deste tecido, o que pode ser facilmente observado em elementos dentários afetados por cárie que se tornam mecanicamente e funcionalmente comprometidos. Uma característica do colágeno presente na dentina é exatamente o número expressivo de ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias, resultado da interação entre grupos aldeídos e grupos amino livres. Essas ligações cruzadas fornecem a estabilidade e a força tensora necessária à estrutura supramolecular. Existem quatro resíduos-chave envolvidos no início das ligações das cadeias do tropocolágeno: dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o N-terminal; e dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o C-terminal (Yamauchi & Sricholpech, 2012). Assim, esses N- e C- terminais podem interagir com os radicais livres advindos da interação da radiação com a molécula de água (Pioch et al., 1992, Fang et al., 2002) produzindo um aumento nas quantidades de Amida I, III e CH₂, devido a um rearranjo molecular do

colágeno (Cheung et al., 1990). Este aumento pode não ser benéfico devido à degradação do colágeno natural, resultando em outro tipo de colágeno que não tem a mesma qualidade que o primeiro. Portanto, as propriedades químicas e mecânicas da dentina irradiada seriam afetadas, o que poderia prejudicar a adesão de materiais restauradores e a resistência aos ácidos (Naves et al., 2012; Yadav & Yadav, 2013).

Ainda em relação à fase orgânica, as diferenças quanto ao tipo de dentina podem ser explicadas devido à estrutura organizacional da dentina humana. Ela possui uma estrutura tubular, formada por túbulos dentinários que se estendem desde a polpa até a junção amelodentinária ou cemento-dentinária (Xu & Wang, 2012). Estes túbulos são rodeados pela dentina peritubular, a qual é um tecido hipermineralizado e contém pouca matriz orgânica, enquanto que eles são separados pela dentina intertubular, composta principalmente de colágeno tipo I, reforçado por apatita (Marshall et al., 1997; Lussi et al., 2011). O conteúdo orgânico da dentina peritubular é menor do que na dentina intertubular (Xu & Wang, 2012). Uma menor densidade de túbulos também é encontrada na raiz (Marshall et al., 1997), portanto, ela tem menos dentina peritubular e mais intertubular. Isso justifica os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que a dentina radicular possui maior quantidade de matriz orgânica que a coronária (Marshall et al., 1997; Xu & Wang, 2012).

Com base nos achados do presente estudo, sugere-se que o aumento do risco de cárie associada à radiação em pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço deve-se não apenas a alterações salivares, dietéticas e microbiológicas, mas também a mudanças na própria composição química da estrutura dentária. Outros estudos são necessários para criar métodos de minimizar esses efeitos da radiação na estrutura dental e estudos clínicos prospectivos poderiam elucidar melhor o risco dessas complicações pós-radioterapia. As taxas de sobrevivência crescentes de pacientes com câncer de cabeça e pescoço mostram, portanto, que a prevenção e o tratamento dos efeitos da radioterapia se tornam uma questão prioritária para as próximas pesquisas, buscando devolver qualidade de vida a esses pacientes.

6. CONCLUSÕES

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

1. A radioterapia foi capaz de alterar a composição química da dentina humana.
2. A radiação pode influenciar a troca de íons fosfato-carbonato na hidroxiapatita e aumentar a concentração dos componentes orgânicos na dentina.
3. A dentina coronária é mais mineralizada do que a radicular, enquanto que esta apresenta uma maior porção orgânica.

REFERÊNCIAS

1. Açıl Y, Springer I, Niehoff P, Gabling V, Warnke P, Açmaz S, et al. Proof of direct radiogenic destruction of collagen in vitro. **Strahlenther Onkol.** 2007;183(7):374-9.
2. Al-Nawas B, Grötz KA, Rose E, Duschner H, Kann P, Wagner W. Using ultrasound transmission velocity to analyze the mechanical properties of teeth after in vitro, in situ, and in vivo irradiation. **Clin Oral Invest.** 2000;4(3):168-72.
3. Avery JK. **Desenvolvimento e histologia bucal.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, Liv. Santos, 2005.
4. Bistey T, Nagy IP, Simó A, Hegedus C. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. **J Dent.** 2007;35(4):325-30.
5. Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. **Dent Mater.** 2005;21(3):232-41.
6. Carvalho RM, Tay F, Sano H, Yoshiyama M, Pashley DH. Long-term mechanical properties of EDTA-demineralized dentin matrix. **J Adhes Dent.** 2000;2(3):193-9.
7. 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;24(5):581-9.
8. Conceição EN. **Dentística: saúde e estética.** 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2007.
9. Cui Y, Fung KH, Xu J, Ma H, Jin Y, He S, et al. Ultrabroadband light absorption by a sawtooth anisotropic metamaterial slab. **Nano Lett.** 2012;12(3):1443-7.
10. Duke ES, Lindemuth J. Variability of clinical dentin substrates. **Am J Dent.** 1991;4(5):241-6.
11. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition.** 2002;18(10):872-9.

12. Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. **Monogr Oral Sci.** 2006;20:66-76.
13. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer.** 2015;136(5):E359-86.
14. Ferreira EMS, Soares LES, Antunes HE, Uemura ST, Barbosa PS, Salmon Jr HA, et al. Effect of therapeutic doses of radiotherapy on the organic and inorganic contents of the deciduous enamel: an in vitro study. **Clin Oral Invest.** 2016;20(8):1953-61.
15. 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(2):148-54.
16. 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.
17. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. Histotomography studies of direct radiogenic dental enamel changes. **Mund Kiefer Gesichtschir.** 1998; 2(2):85-90.
18. Grötz KA, Duschner H, Wagner W. Confocal laser scanning microscopy (CLSM): histotomography of altered dental hard tissue in pathological mouth cavity ecology. **Mund Kiefer Gesichtschir.** 1997;1(1):39-43.
19. INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** Rio de Janeiro: INCA, 2015, 122 p.
20. Jastrzebska M, Wrzalik R, Kocot A, Zalewska-Rejdak J, Cwalina B. Raman spectroscopic study of glutaraldehyde-stabilized collagen and pericardium tissue. **J Biomater Sci Polym Ed.** 2003;14(2):185-97.
21. Jawad H, Hodson NA, Nixon PJ. A review of dental treatment of head and neck cancer patients, before, during and after radiotherapy: part 1. **Br Dent J.** 2015;218(2):65-8.

22. Jiang T, Ma X, Wang Y, Zhu Z, Tong H, Hu J. Effects of hydrogen peroxide on human dentin structure. **J Dent Res**. 2007;86(12):1040-5.
23. Kielbassa AM, Beetz J, Schendera A, Hellwing E. Irradiation effects on microhardness of fluoridated and non-fluoridated bovine dentin. **Eur J Oral Sci**. 1997;105(5Pt1):444-7.
24. Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. Radiation-related damage to dentition. **Lancet Oncol**. 2006; 7(4):326-35.
25. Kielbassa AM, Wrbas KT, Schuler-Mönting J, Hellwing E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ induced demineralization in irradiated and non irradiated human dental enamel. **Arch Oral Biol**. 1999;44(3):243-51.
26. Leventouri Th, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age. **Int J Biomater**. 2009;2009.
27. Liang X, Zhang JY, Cheng IK, Li JK. Effect of high X-ray irradiation on the nano-mechanical properties of human enamel and dentine. **Braz Oral Res**. 2016;30:e9.
28. Lieshout HF, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue – a systematic review. **Clin Oral Invest**. 2014;18(1):17-24.
29. Liu Y, Hsu CY. Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. **J Dent**. 2007;35(3):226-30.
30. Liu Y, Yao X, Liu YW, Wang Y. A Fourier transform infrared spectroscopy analysis of carious dentin from transparent zone to normal zone. **Caries Res**. 2014;48(4):320-9.
31. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion – an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Res**. 2011;45(suppl1):2-12.
32. Marmary Y, Adar R, Gaska S, Wygoda A, Maly A, Cohen J, et al. Radiation-induced loss of salivary gland function is driven by cellular senescence and prevented by IL6 modulation. **Cancer Res**. 2016;76(5):1170-80.

33. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent.** 1997;25(6):441-58.
34. McGuire JD, Mousa AA, Zhang BJ, Todoki LS, Huffman NT, Chandrababu KB, et al. Extracts of irradiated mature human tooth crowns contain MMP-20 protein and activity. **J Dent.** 2014;42(5):626-35.
35. Mellara TS, Palma-Dibb RG, Oliveira HF, Paula-Silva FWG, Nelson-Filho P, Silva RAB, 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):1-7.
36. Nanci A. **Ten Cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função.** 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
37. Naves LZ, Novais VR, Armstrong SR, Correr-Sobrinho L, Soares CJ. Effect of gamma radiation on bonding to human enamel and dentin, **Support Care Cancer.** 2012;20(11):2873-8.
38. Novais VR, Soares PB, Guimarães CM, Schliebe LR, Braga SSL, Soares CJ. Effect of gamma radiation and endodontic treatment on mechanical properties of human and bovine root dentin. **Braz Oral Res.** 2016;27(6):670-4.
39. 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(6):241-4.
40. Pow EH, McMillan AS, Leung WK, Kwong DL, Wong MC. Oral health condition in southern Chinese after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma: extent and nature of the problem. **Oral Dis.** 2003; 9(4):196-202.
41. Pucéat E, Reynard B, Lécuyer C. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites?. **Chem Geol.** 2004;205(1-2):83-97.
42. Qing P, Huang S, Gao S, Qian L, Yu H. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth enamel. **Sci Rep.** 2015; 5:1-9.

43. Qing P, Huang S, Gao S, Qian L, Yu H. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth dentin. **Clin Oral Invest.** 2016;20(9):2379-86.
44. 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.
45. Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study. **Calcif Tissue Int.** 1989;45(3):157-64.
46. Reyes-Gasga J, Martínez-Piñeiro EL, Rodríguez-Álvarez G, Tiznado-Orozco GE, García-García R, Brès 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.
47. Salehi H, Terrer E, Panayotov I, Levallois B, Jacquot B, Tassery H, et al. Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy. **J Biophotonics.** 2013;6(10):765-74.
48. Shellis RP, Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. **Monogr Oral Sci.** 2014;25:163-79.
49. Silva AR, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation related caries. **Caries Res.** 2009;43(1):43-9.
50. Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PCF, Naves LZ, et al. Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. **J Dent Res.** 2010;89(2):159-64.
51. 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(5):659-64.
52. Toledano M, Aguilera FS, Osorio E, Cabello I, Toledano-Osorio M, Osorio R. Functional and molecular structural analysis of dentine interfaces promoted by a Zn-doped self-etching adhesive and an in vitro load cycling model. **J Mech Behav Biomed Mater.** 2015;50:131-49.

53. Tolentino ES, Centurion BS, Ferreira LHC, Souza AP, Damante JH, Rubira-Bullen IRF. Oral adverse effects of head and neck radiotherapy: literature review and suggestion of a clinical oral care guideline for irradiated patients. **J Appl Oral Sci.** 2011;19(5):448-54.
54. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiological trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.** 2014;26(2):123-41.
55. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2003;14(3):199-212.
56. Walker MP, Wichman B, Cheng A, Coster J, Williams K. Impact of radiotherapy dose on dentition breakdown in head and neck cancer patients. **Pract Radiat Oncol.** 2011;1(3):142-8.
57. Xu C, Wang Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. **Arch Oral Biol.** 2012;57(4):383-91.
58. Xu C, Wang Y. Cross-linked demineralized dentin maintains its mechanical stability when challenged by bacterial collagenase. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 2011;96(2):242-8.
59. Yadav S, Yadav H. Ionizing irradiation affects the microtensile resin dentin bond strength under simulated clinical conditions. **J Conserv Dent.** 2013;16(2):148-51.
60. Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. **Essays Biochem.** 2012;52:113-33.
61. Zieba-Palus J, Kunicki M. Application of the micro-FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRF method examination of inks. **Forensic Sci Int.** 2006;158(2-3):164-72.

RELEASE PARA IMPRENSA

O número de casos de câncer vem aumentando cada vez mais na população mundial. Quando localizado na região de cabeça e pescoço, muitas vezes o tratamento abrange a cavidade oral dos pacientes. Na maioria dos casos um dos tratamentos utilizados é a radioterapia, que utiliza raios X para diminuir o volume do câncer. A radioterapia destrói as células cancerígenas, diminuindo o tamanho do tumor. Entretanto, há uma preocupação com relação aos efeitos colaterais da radioterapia, porque a radiação acaba atingindo áreas saudáveis próximas ao tumor, alterando tecidos não neoplásicos. Quando o campo da radiação inclui a cavidade oral dos pacientes, esses danos são preocupantes devido à grande quantidade de estruturas nobres nessa região (osso, dentes, mucosas, glândulas salivares). A radiação em contato com essas estruturas gera algumas reações adversas, como a destruição dos ductos das glândulas salivares provocando a hipossalivação, desenvolvimento de mucosites, osteorradionecrose e cáries de radiação. Essas alterações diminuem a qualidade de vida dos pacientes que são submetidos a esse tratamento. Além do paciente oncológico já estar fisicamente e psicologicamente debilitado, esses incômodos bucais podem fazer com que o paciente não se alimente corretamente, o que pode comprometer o andamento do tratamento do câncer. Dessa forma, torna-se de grande importância estudar os efeitos da radioterapia sobre as estruturas bucais. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações químicas que a radioterapia provoca nos tecidos do dente, mais precisamente na dentina. Os resultados mostram que a radiação interfere na composição química da dentina, fato este que poderiam explicar o desenvolvimento e progressão das chamadas cáries de radiação. Os dentes ficariam comprometidos internamente, facilitando a instalação da doença cárie. Portanto, o aumento do risco de cárie associada à radiação em pacientes submetidos à radioterapia não se deve apenas a alterações na saliva, na dieta e nas bactérias, mas também a mudanças na própria composição química dos dentes. Assim, o cirurgião-dentista deve ter um cuidado especial durante os procedimentos odontológicos ao tratar pacientes oncológicos, buscando minimizar possíveis

falhas, visto que os dentes já se encontram alterados frente à radioterapia e isso, por si só, já compromete a longevidade do tratamento odontológico.

ANEXOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de diferentes técnicas de radioterapia nas propriedades químicas e mecânicas do esmalte e da dentina

Pesquisador: Veridiana Resende Novais

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50329715.6.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.372.193

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: A incidência e prevalência do câncer têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas. No Brasil, a estimativa para 2014/2015 é de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer (INCA, 2014). Dentro os tipos de câncer, o de cabeça e pescoço é considerado um dos principais tumores malignos, sendo a quinta neoplasia mais frequente no mundo, com uma incidência mundial de 780 mil novos casos por ano. A maior parte desses cânceres são tratados com cirurgia ou radioterapia, ou uma combinação das duas técnicas. pacientes tratados com radioterapia podem ter vários efeitos colaterais na cavidade oral, dentre eles mucosite, disfagia, disgeusia, infecções por cândida, trismo, xerostomia, cáries de radiação e osteorradionecrose (Tolentino et al., 2011; Jawad, Hodson & Nixon, 2015). Estes efeitos, sejam eles diretos ou indiretos, podem predispor o desenvolvimento e progressão de cáries de radiação. Os efeitos indiretos compreendem mudanças na quantidade e qualidade salivar, dificuldade de higienização bucal adequada, adoção de dieta pastosa devido à dificuldade de deglutição e alterações na flora bacteriana (Vissink et al., 2003; Kielbassa et al., 2006; Silva et al., 2010). Há também efeitos diretos sobre os dentes, que englobam alterações morfológicas na estrutura dentária, na junção amelodentinária, na solubilidade ácida do esmalte e na microdureza do esmalte e da dentina (Al-Nawas et al., 2000; Kielbassa et al., 2006; Silva et al., 2009; Soares et

Endereço: Av. João Naves 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: cep@propp.ufu.br

al., 2011; Gonçalves et al., 2014; Qing et al., 2015). Deve-se buscar desenvolver modelos experimentais mais fidedignos aos protocolos de radioterapia verdadeiramente aplicados aos pacientes, que proporcionariam uma melhor compreensão das alterações estruturais do esmalte e dentina irradiados. Nesse contexto, este trabalho propõe definir o protocolo de radiação mais adequado para a realização de trabalhos experimentais in vitro com dentes humanos.

Hipótese: A hipótese desse estudo é que diferentes técnicas de radioterapia têm efeitos diferentes sobre as propriedades químicas e mecânicas do esmalte, dentina coronária e dentina radicular.

O objetivo deste trabalho é verificar o efeito de diferentes técnicas de radioterapia sobre a estrutura do esmalte, da dentina coronária e da dentina radicular. Para isso, 90 dentes terceiros molares hígidos serão divididos em três grupos (n=30): grupo não irradiado (controle); grupo irradiado perpendicularmente ao longo eixo do dente; grupo irradiado paralelamente ao longo eixo do dente. Os grupos irradiados receberão 2 Gy diários, 5 dias por semana durante 7 semanas, totalizando 70 Gy. Serão utilizados ainda 30 dentes irradiados in situ, ou seja, serão extraídos de pacientes que foram submetidos ao tratamento radioterápico para o tratamento de câncer na região de cabeça e pescoço. Os métodos de análise serão Ensaio dinâmico de Microdureza Vickers, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDX), Ensaio mecânico de resistência à microtração e Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR). Caso os dados das análises quantitativas apresentem distribuição normal será empregada ANOVA fatorial ($\alpha=0,05$) e caso ocorra diferença, será empregado o Teste de Tukey.

Caso não apresente distribuição normal, os dados serão analisados com teste não-paramétrico de Kruskal Wallis. Além disso, será feita a análise qualitativa das imagens.

Serão coletados 90 dentes terceiros molares humanos e 30 dentes de pacientes submetidos à radioterapia; esse número está apoiado em vários métodos estatísticos de cálculo amostral bem explicados no projeto. 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. Os dentes serão coletados nas Clínicas de Cirurgia da FOUFU, no Pronto Socorro Odontológico e no Programa de Cuidados Específicos a Doenças Estomatológicas (PROCEDE).

o, 90 dentes serão divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=30): não irradiado (controle); irradiado perpendicularmente ao longo eixo do dente in vitro e irradiado paralelamente ao longo eixo do dente in vitro. Os dentes serão submetidos ao protocolo radioterápico utilizado pelos pacientes do Hospital do Câncer da Universidade Federal do Triângulo Mineiro a partir do

Continuação do Parecer: 1.372.193

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 7 semanas, totalizando 70 Gy.

Critério de Inclusão: Objetivo 1: Dentes terceiros molares hígidos de pacientes com mais de 18 anos de idade. Objetivo 2: Dentes de pacientes com mais de 18 anos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço para tratamento de câncer.

Critério de Exclusão: Objetivo 1: Dentes que não sejam terceiros molares e dentes terceiros molares com presença de cáries, restaurações e/ou defeitos estruturais; Dentes de pacientes menores de idade. Objetivo 2: Dentes de pacientes menores de idade.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Compreender o efeito de diferentes protocolos de radioterapia sobre a estrutura do esmalte e da dentina humanos. Este trabalho será dividido em dois objetivos: Objetivo 1. Avaliar a microdureza, módulo de elasticidade, resistência à microtração, perda mineral e composição química de dentes humanos variando a técnica de irradiação e a estrutura dentária (esmalte, dentina coronária e dentina radicular). Para isso, 90 dentes serão divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=30): não irradiado (controle); irradiado perpendicularmente ao longo eixo do dente in vitro e irradiado paralelamente ao longo eixo do dente in vitro. Os dentes serão submetidos ao protocolo radioterápico utilizado pelos pacientes do Hospital do Câncer 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 7 semanas, totalizando 70 Gy. Para análise da microdureza e módulo de elasticidade, dez dentes de cada grupo serão seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária, para remoção das raízes. Cada coroa será seccionada no sentido mesio/distal, obtendo-se duas hemisecções (vestibular e lingual ou palatina). A hemisecção vestibular será cortada ao meio, obtendo-se duas partes, esquerda e direita, que corresponderão as análises para esmalte e dentina coronárias, respectivamente. Já as raízes serão seccionadas em três terços e para analisar as propriedades da dentina radicular será usado o terço médio. Para avaliação da composição química e da perda mineral, por meio do FTIR, MEV e EDX, outros dez dentes por grupo serão igualmente preparados. Para o ensaio de resistência de união - Microtração (Microtensile OM100 Odeme Dental Research), dez dentes serão preparados em formato de palito ($\pm 1,0\text{mm}^2$). Posteriormente será feita a classificação do padrão de falha dos palitos fraturados por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Cinco palitos de cada grupo serão levados ao MEV sem a realização do ensaio

Endereço: Av. João Naves 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: cep@propp.ufu.br

Página 03 de 07

Continuação do Parecer: 1.372.193

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 7 semanas, totalizando 70 Gy.

Critério de Inclusão: Objetivo 1: Dentes terceiros molares hígidos de pacientes com mais de 18 anos de idade. Objetivo 2: Dentes de pacientes com mais de 18 anos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço para tratamento de câncer.

Critério de Exclusão: Objetivo 1: Dentes que não sejam terceiros molares e dentes terceiros molares com presença de cáries, restaurações e/ou defeitos estruturais; Dentes de pacientes menores de idade. Objetivo 2: Dentes de pacientes menores de idade.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Compreender o efeito de diferentes protocolos de radioterapia sobre a estrutura do esmalte e da dentina humanos. Este trabalho será dividido em dois objetivos: Objetivo 1. Avaliar a microdureza, módulo de elasticidade, resistência à microtração, perda mineral e composição química de dentes humanos variando a técnica de irradiação e a estrutura dentária (esmalte, dentina coronária e dentina radicular). Para isso, 90 dentes serão divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=30): não irradiado (controle); irradiado perpendicularmente ao longo eixo do dente in vitro e irradiado paralelamente ao longo eixo do dente in vitro. Os dentes serão submetidos ao protocolo radioterápico utilizado pelos pacientes do Hospital do Câncer 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 7 semanas, totalizando 70 Gy. Para análise da microdureza e módulo de elasticidade, dez dentes de cada grupo serão seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária, para remoção das raízes. Cada coroa será seccionada no sentido mesio/distal, obtendo-se duas hemisseções (vestibular e lingual ou palatina). A hemisseção vestibular será cortada ao meio, obtendo-se duas partes, esquerda e direita, que corresponderão as análises para esmalte e dentina coronárias, respectivamente. Já as raízes serão seccionadas em três terços e para analisar as propriedades da dentina radicular será usado o terço médio. Para avaliação da composição química e da perda mineral, por meio do FTIR, MEV e EDX, outros dez dentes por grupo serão igualmente preparados. Para o ensaio de resistência de união - Microtração (Microtensile OM100 Odeme Dental Research), dez dentes serão preparados em formato de palito ($\pm 1,0\text{mm}^2$). Posteriormente será feita a classificação do padrão de falha dos palitos fraturados por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Cinco palitos de cada grupo serão levados ao MEV sem a realização do ensaio

Endereço: Av. João Naves 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: cep@propp.ufu.br

Página 03 de 07

Continuação do Parecer: 1.372.193

mecânico para avaliação da interface adesiva. Objetivo 2. Avaliar a microdureza, módulo de elasticidade, resistência à microtração, perda mineral e composição química de dentes humanos extraídos de pacientes submetidos ao tratamento radioterápico para o tratamento de câncer na região de cabeça e pescoço (irradiados in situ), variando a estrutura dentária (esmalte, dentina coronária e dentina radicular). Para isso, 30 dentes serão divididos aleatoriamente nas metodologias propostas. Para análise da microdureza e módulo de elasticidade, dez dentes serão seccionados conforme o objetivo 1. Para avaliação da composição química e da perda mineral, outros dez dentes por grupo serão igualmente preparados. Para o ensaio de resistência de união - Microtração (Microtensile OM100 Odeme Dental Research), dez dentes serão preparados em formato de palito ($\pm 1,0\text{mm}^2$). Posteriormente será feita a classificação do padrão de falha dos palitos fraturados por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Cinco palitos de cada grupo serão levados ao MEV sem a realização do ensaio mecânico para avaliação da interface adesiva.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos: cirúrgico, inerente ao procedimento de extração dentária e o da identificação do participante, o que os pesquisadores se comprometem a cumprir a Res. 486/12.

Benefícios: Por meio desse trabalho, os pesquisadores buscam estabelecer o protocolo de radiação mais adequado para a realização de trabalhos experimentais in vitro com dentes humanos. Além disso, procuram responder questões na tentativa de melhorar a qualidade de vida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e que são submetidos a tratamento radioterápico. Os resultados obtidos possibilitarão aos cirurgiões dentistas compreenderem de maneira mais aprofundada as alterações que ocorrem nos tecidos dentais desses pacientes, o que pode guiar os profissionais quanto à melhor forma de tratar e restabelecer a saúde bucal dos mesmos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho bem apresentado e bem desenvolvido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados: TCLE compreensível para o leigo.

Recomendações:

Não há.

Endereço: Av. João Naves 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: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.372.193

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Julho de 2016.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Julho de 2017.

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

O CEP/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 CEP/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 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

Endereço: Av. João Naves 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: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.372.193

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).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_810152.pdf	16/10/2015 17:08:38		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_clinica_cirurgia.pdf	16/10/2015 17:04:04	Veridiana Resende Novais	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_pronto_socorro_odontologico.pdf	16/10/2015 17:03:43	Veridiana Resende Novais	Aceito
Outros	Solicitacao_de_pesquisador_para_instituicao_coparticipante.pdf	16/10/2015 16:19:54	Veridiana Resende Novais	Aceito
Outros	Links_curriculos_lattes_pesquisadores.pdf	16/10/2015 15:59:21	Veridiana Resende Novais	Aceito
Outros	Calculo_amstral.pdf	16/10/2015 15:58:37	Veridiana Resende Novais	Aceito
Outros	Instrumento_coleta_dados.pdf	16/10/2015 15:56:43	Veridiana Resende Novais	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa_dissertacao.pdf	16/10/2015 15:55:56	Veridiana Resende Novais	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_equipe_executiva.pdf	16/10/2015 15:55:27	Veridiana Resende Novais	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Instituicao_irradiacao_dentes.pdf	16/10/2015 15:54:50	Veridiana Resende Novais	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_instituicao_coparticipante.pdf	16/10/2015 15:54:33	Veridiana Resende Novais	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Modelo_TCLE.pdf	16/10/2015 15:40:08	Veridiana Resende Novais	Aceito

Endereço: Av. João Naves 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: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.372.193

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	16/10/2015 15:39:34	Veridiana Resende Novais	Aceito
----------------	--------------------	------------------------	-----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 16 de Dezembro de 2015

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves 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