



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA



RENATA DE PAULA VARGAS

**EFEITO DA RADIOTERAPIA E DO FLÚOR
NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS DO ESMALTE
SUBMETIDO A CICLAGEM DE PH IN VITRO**

Uberlândia

2018

RENATA DE PAULA VARGAS

**EFEITO DA RADIOTERAPIA E DO FLÚOR
NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS DO ESMALTE
SUBMETIDO A CICLAGEM DE PH IN VITRO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de
Odontologia da UFU, como
requisito parcial para obtenção do
título de Graduado em
Odontologia.

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

Co-Orientadora: M^ª. Camila de
Carvalho Almança Lopes.

Uberlândia

2018

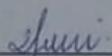


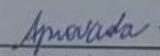
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

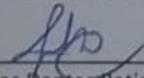
ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Renata de Paula Vargas** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

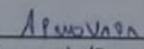
No dia 24 de maio de 2018, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo(a) aluno(a) **Renata de Paula Vargas**, COM O TÍTULO: “EFEITO DA RADIOTERAPIA E DO FLÚOR NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO ESMALTE SUBMETIDO A CICLAGEM DE PH IN VITRO”. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo se encontra em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

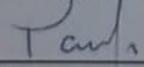
Uberlândia, 24 de maio de 2018.

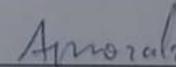

 Profª. Drª. Veridiana Resende Novais Simamoto
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU

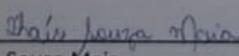

 Aprovado/Reprovado

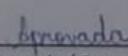

 Prof. Dr. Jonas Dantes Batista
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU


 Aprovado/Reprovado


 Prof. Dr. Paulo César Simamoto Júnior
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU


 Aprovado/Reprovado


 Thaís Souza Maia
 Aluno(a) de doutorado – PPGO/UFU


 Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

A Deus,

Pelo dom da vida, pela minha saúde e
por andares ao meu lado nesta trajetória.

Aos meus pais, Ademir e Geralda

Por abdicarem seus sonhos em favor dos meus,
Pelos seus sacrifícios para me ver feliz
Pela dedicação de suas vidas à mim
Pela conquista que se diz minha, mas que é de vocês
Graças a vocês que eu posso vivenciar este momento,
Obrigada pela minha vida, amo vocês.

Aos meus irmãos, Raul e Kenner

Por todo cuidado,
Por todo carinho,
Por toda parceria,
Por todos os momentos de dificuldades e de alegria
Por toda dedicação de vocês neste sonho.
Amo-os.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a minha intercessora Virgem Maria, por me permitir essa conquista. Por terem me socorrido muitas vezes em momentos de desespero, e por alimentar as minhas forças para que eu pudesse conseguir completar essa etapa com muito louvor.

Agradeço meus pais, Ademir e Geralda, que não souberam medir esforços em nenhum momento da minha vida e foram fundamentais na concretização deste sonho.

Agradeço meus irmãos pelo apoio, incentivo, carinho e companheirismo.

Aos meus tios, primos, sobrinhos, cunhada e enfim... Toda a minha família que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a seguir em frente.

Aos meus professores, que não só transmitiram conhecimentos técnico-científico, mas me mostraram que para todo embasamento teórico é preciso ter paixão pelo o que se faz. Com vocês aprendi a olhar para o ser humano com uma visão mais humana e a vestir a camisa pela odontologia.

Em especial agradeço a professora Dr^a Veridiana, minha orientadora por ter me recebido de braços abertos ao seu grupo de pesquisas. Agradeço o carinho, paciência e entendimento nas minhas limitações neste trabalho. Essa aproximação aumentou ainda mais minha admiração e acendeu em mim, a determinação de continuar a lutar pelo meu grande sonho.

A minha coorientadora Camila por toda paciência, compreensão e incentivo. Foi incrível aprender a pesquisar com uma pessoa com o coração enorme, muito competente e que tem muita humildade. Agradeço por todo aprendizado, por me fazer estudar cada vez mais. Sempre carregarei comigo o seu exemplo de simplicidade e disciplina em tudo que eu fizer.

A Doutora Renata Borges, a pessoa com quem me simpatizei desde a primeira vez que a vi. Agradeço por todo incentivo e por acreditar no meu amor por pesquisas, carrego comigo boas lembranças, gratidão e um carinho enorme.

Aos funcionários da UFU, por todo respeito e amizade.

A Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), pela parceria e dedicação no processo da radioterapia nos dentes. Essa contribuição foi muito importante para o andamento da pesquisa.

Ao laboratório de Tecnologia em Atrito e Desgaste (LTAD) da faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia, pela ajuda na realização dos ensaios de microdureza e modulo de elasticidade das amostras.

Ao Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular (CPbio), onde passei grandes momentos de amizade, de descobertas e aprendizado. A toda equipe que cuida deste laboratório, aos técnicos que sempre nos auxiliam em tudo que é possível.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos oferecidos neste trabalho.

Aos meus amigos, aqueles de longa data e aqueles que conheci na graduação, que me acompanharam nessa trajetória.

Á todos que contribuíram de forma direta e indireta, para a concretização deste sonho. O meu muito obrigado.

Epígrafe

“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
Mas continue em frente de qualquer jeito”.
Martin Luther King.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da radioterapia, associada ou não a aplicação tópica de flúor gel neutro, na composição química e nas propriedades mecânicas do esmalte após ciclagem de pH *in vitro*. Trinta terceiros molares foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=10): 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 Gy. Alterações químicas do esmalte foram quantificadas por meio de Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR). Os parâmetros avaliados foram: razão matriz/mineral (M/M) e conteúdo relativo de carbono (CRC). Também foi realizada avaliação da microdureza (VHN) e do módulo de elasticidade (*E*) do esmalte em três profundidades (superficial, médio e profundo). M:M, CRC 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 ($\alpha < 0,05$). A análise por FTIR (M/M e CRC) mostrou diferenças significativas para irradiação, ciclagem de pH e interação entre os fatores ($p < 0,001$). Sem a ciclagem de pH, o grupo IF apresentou a menor razão matriz/mineral orgânico e conteúdo relativo de carbonato. Com a ciclagem de pH, a relação matriz orgânica/mineral aumentou e o conteúdo relativo de carbonato diminuiu, com exceção do IF. A VHN foi influenciada apenas pela ciclagem de pH ($p < 0,001$), com valores mais elevados de VHN com a ciclagem de pH. ANOVA detectou diferenças significativas no *E* para irradiação ($p < 0,001$), ciclagem de pH ($p < 0,001$) e para a interação irradiação e ciclagem de pH ($p < 0,001$). Um aumento do *E* foi encontrado para o grupo IU sem ciclagem de pH. Com a ciclagem de pH, os grupos IU e IF foram semelhantes e apresentaram valores mais elevados que o NI. O fluoreto associado a radioterapia reduz a exposição da matriz orgânica e ajuda a manter a morfologia externa do esmalte irradiado. No entanto, não foi tão eficaz na preservação das propriedades mecânicas do esmalte. A radioterapia alterou o módulo elástico do esmalte e sua composição química.

Palavras chave: Desmineralização do dente, Esmalte dentário, 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 of enamel demineralization *in vitro*. Thirty third molars were randomly divided into three groups (n = 10): Non-irradiated (NI); Irradiated in relative humidity (UI); and fluorinated neutral gel (IF). Each group was subdivided into two subgroups (n = 5) according to the presence of pH cycling: with and without cycling. The teeth of the IU and IF groups were submitted to an irradiation protocol of 2Gy daily, five days a week, during seven weeks, totalizing 70 Gy. Chemical changes of enamel were quantified using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The parameters evaluated were: matrix / mineral ratio (M / M) and relative carbon content (CRC). It was also evaluated the microhardness (VHN) and the modulus of elasticity (E) of the enamel at three depths (superficial, medium and deep). M: M and CRC were analyzed using two-way ANOVA and VHN and E data were analyzed using three-way ANOVA followed by the Tukey HSD test ($\alpha < 0.05$). The FTIR analysis (M / M and RCC) showed significant differences for irradiation, pH cycling and interaction between the factors ($p < 0.001$). Without the pH cycling, the IF group presented the lowest organic matrix / mineral ratio and relative carbonate content. With the pH cycling, the organic / mineral matrix ratio increased and the relative carbonate content decreased, with the exception of the IF. VHN was influenced only by pH cycling ($p < 0.001$), with higher values of VHN with pH cycling. ANOVA detected significant differences in E for irradiation ($p < 0.001$), pH cycling ($p < 0.001$) and for interaction between irradiation and pH cycling ($p < 0.001$). An increase in E was found for the UI group without pH cycling. With pH cycling, the IU and IF groups were similar and presented higher values than NI. Fluoride associated with radiotherapy reduces exposure of the organic matrix and helps maintain the external morphology of irradiated enamel. However, it was not as effective in preserving the mechanical properties of enamel. Radiotherapy altered the elastic modulus of the enamel and its chemical composition.

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

SUMÁRIO

1- Introdução.....	11
2- Revisão de literatura.....	12
3- Objetivo.....	15
4- Materiais e métodos.....	16
4.1- Delineamento experimental.....	16
4.2- Obtenção, seleção e armazenamento dos dentes.....	17
4.3- Irradiação dos dentes dos dentes.....	18
4.4- Preparo dos dentes.....	20
4.5- Processo de ciclagem do pH.....	21
4.6- Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR)	22
4.7- Ensaio de Dureza (VHN) e Módulo de elasticidade (E)	23
4.8-Análise Estatística.....	24
5- Resultados.....	26
5.1- Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR).....	27
5.2- Microdureza (VHN) e Módulo de elasticidade (E).....	28
6- Discussão.....	30
7- Conclusões.....	36
8- Referências bibliográficas	36
Anexo Comitê de ética.....	44

1- INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. Sua origem se dá por condições multifatoriais que podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer. Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2016, 11.140 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (*Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil* - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva).

O tratamento do câncer pode ser feito por meio de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade (Beumer, Curtis e Marunick *et al.*, 1996). A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes (Pro-Onco *et al.*, 1993). A radiação ionizante, apesar de apresentar a vantagem de preservar a estrutura dos tecidos, por não ser um tratamento invasivo, acarreta inúmeras reações adversas que afetam de forma significativa à qualidade de vida dos pacientes, podendo interferir inclusive no andamento do tratamento (Specht *et al.*, 2002; Vissink, *et al.*, 2003). 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 (Caccelli e Raport *et al.*, 2008). Esses danos são particularmente evidentes na região de cabeça e pescoço onde a variedade de estruturas e suas respectivas radiosensibilidades são grandes (Kielbassa *et al.*, 2006). Sinais e sintomas incluindo mucosites (Denham *et al.*, 1999), hipossalivação e consequente xerostomia (Thomson *et al.*, 2007), osteoradionecrose (Notani *et al.*, 2003) e cáries de irradiação (Kielbassa *et al.*, 2006), são comumente relatados.

A cárie dentária resulta da desmineralização dos dentes por ácido láctico produzido a partir da fermentação de carboidratos por bactérias facultativas gram-positivas (Takahashi e Nyvad *et al.*, 2011). A cárie de radiação é principalmente um efeito indireto das mudanças induzidas pela radiação no tecido das glândulas salivares que resultam em hipossalivação, composição salivar alterada, diminuição do pH, redução da capacidade de tamponamento, aumento da viscosidade, mudança na flora bucal em direção a bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans*, lactobacilos), e mudanças na dieta (Otmani *et al.*, 2007). A cárie de radiação ocorre em locais diferentes do que em cárie dental

comum. Os locais mais afetados pós-radioterapia são as superfícies vestibulares da região cervical, pontas de cúspides e incisais (Walker *et al.*, 2001). A cárie de radiação pode se desenvolver de repente, mudando a cor e a translucidez da superfície dental, podendo levar à amputação de coroas e à perda total da dentição (Kielbassa *et al.*, 2004).

O flúor tem se provado ser um tratamento eficaz para a prevenção da cárie dentária, reduzindo a desmineralização, aumentando a remineralização (Wefel *et al.*, 1990), reduzindo a atividade metabólica de bactérias, assim como a permeabilidade do esmalte (Cury *et al.*, 2001). O flúor pode ser aplicado na forma de pastas dentais, enxaguatórios bucais e selantes e fissuras, entre outros, no entanto seu efeito anticariogênico dependerá do produto formado no esmalte e sua retenção na superfície do esmalte ao longo do tempo. Não há protocolo universal para o tratamento de cáries relacionadas à radiação; no entanto, a importância do flúor é bem reconhecida (Beech *et al.*, 2014). A aplicação tópica diária de 1% de gel de fluoreto de sódio neutro com portadores mostrou reduzir a cárie relacionada à radiação (Jansma *et al.*, 1989; Caielli *et al.*, 1995). No entanto, nenhum estudo avaliou o efeito do gel de flúor neutro em contato com o esmalte durante o processo de radiação ionizante nas propriedades do esmalte. Nesse contexto, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito da aplicação tópica de flúor durante a irradiação na composição química (ATR-FTIR) e propriedades mecânicas (Vharders Microhardness - VHN e Elastic Modulus - E) de esmalte dentário sadio e ciclado. A hipótese nula testada foi que o flúor aplicado durante a irradiação não teria efeito sobre as propriedades do esmalte.

2- REVISÃO DE LITERATURA

Estudos recentes têm sido realizados com o objetivo de entender as modificações relacionadas no esmalte dental decorrentes da radiação ionizante pela qual são submetidos pacientes oncológicos.

Em 2009, Silva *et al.* realizaram um estudo para analisar os padrões de desmineralização dos dentes de pacientes irradiados e das lesões que causam danos a dentição que estão relacionados a radiação ionizante. Nesse estudo foram utilizados 36 dentes que foram avaliados por microscopia de luz polarizada e por microscopia eletrônica de varredura. Nota-se que as amostras apresentaram processo cariioso decorrente da radiação e escurecimento de esmalte dental, destacando uma coloração

marrom difusa, área desmineralizada e na camada mais profunda apresentando dentina reacional originada por odontoblastos em resultado a agressão que o dente sofreu.

Em 2011, Hamba *et al.* realizaram uma pesquisa sobre os efeitos da caseína fosfopéptido-amorfo e fosfato de cálcio (CPP-ACP) e do CPP-ACPF (com flúor) na inibição da desmineralização do esmalte dental, ao longo tempo. Estes efeitos foram analisados através da micro-tomografia computadorizada (micro-CT). Foram utilizados 8 dentes incisivos bovinos que após a extração foram mantidos resfriados. Posteriormente cada dente foi seccionado em 6 blocos, totalizando 48 espécimes, e esses espécimes passaram 30 minutos durante 7 dias imersas nesses agentes. Logo esses espécimes foram imersos numa solução desmineralizante com um pH de 4,5; com isso houve perda mineral (ML) e formação de lesão que foram analisadas utilizando o micro-CT. Feito essas análises, eles obtiveram como resultado que as amostras que passaram pelas soluções CPP-ACP ou CPP-ACPF, a superfície do esmalte era inibida pela desmineralização, havendo uma maior inibição da desmineralização na solução (CPP-ACPF). O micro-CT foi essencial para realizar essas análises e na detecção das mudanças da densidade mineral dessas amostras.

Em 2011, Soares *et al.* realizaram um estudo sobre a eficácia do enxaguante bucal de clorexidina e de fluoreto de sódio na prevenção do dano da radioterapia a resistência à tração que ainda era desconhecida no esmalte e dentina. Foram utilizados 120 dentes divididos em dois grupos: irradiado e não irradiado. E esses dois grupos foram então subdivididos em dois protocolos de bochechos realizados três vezes ao dia: clorexidina a 0,12 % e fluoreto de sódio a 0,05% e um grupo controle (n=10). Foram realizados testes de microtração. Os resultados obtidos pelo teste Tukey ($p < 0,05$) mostraram uma redução da resistência do esmalte e da dentina coronária e radicular pela radioterapia. Foram observadas também alterações macro estruturais pela microscopia eletrônica de varredura. O estudo mostrou que bochechos de clorexidina a 0,12% preveniram parcialmente os danos da irradiação sobre as propriedades mecânicas da dentina coronária, enquanto que o grupo fluoreto de sódio apresentou resistência similar ao esmalte controle.

Em 2014, Clifton M *et al.* realizaram pesquisas para analisar a atuação do flúor na prevenção da cárie dentária. Dentre esse fator de estudo destacavam-se a forma sistêmica e tópica, sendo a forma sistêmica utilizado em crianças com dentes em formação e a

topicamente disponibilizado para a comunidade através de água, alimentos processados, bebidas, cremes dentais, enxaguatórios, géis, espumas e vernizes. O objetivo deste estudo era compreender a eficácia do flúor sem que houvesse a fluorose pelo excesso do flúor. Desta forma, foram realizadas revisões na literatura e estudos sobre as evidências recentes com o foco na água da comunidade, fluoretação e políticas, o flúor presente nos dentifrícios, composições do verniz fluoretado. Discutindo as mudanças nas propostas na política pública dos Estados Unidos. Como conclusão diante a essas pesquisas, pode-se afirmar que foi possível reduzir a cárie dentária em concentrações baixas de flúor, não sendo necessária altas concentrações de flúor, sendo o flúor um fator eficaz na prevenção do processo cariioso.

Em 2014, Gonçalves *et al.* realizaram um estudo *in vitro* sobre os efeitos da radioterapia nas propriedades mecânicas e morfológicas do esmalte da dentina de dentes permanentes. Os dentes foram submetidos à radiação ionizante de 10 Gy até uma dose cumulativa de 60 Gy. A dureza do esmalte e da dentina foi avaliada em três profundidades (superficial média e profunda). Os dados foram analisados por meio de análise de variâncias em dois fatores e teste de Tukey ao nível de significância de 5%. A morfologia do esmalte e da dentina foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) por uma análise semi-quantitativa. Os dados foram analisados usando Kruskal-Wallis e Dunn's ou teste exato de Fisher ao nível de significância de 5%. Ao final do trabalho observou-se que a radiação ionizante não alterou a microdureza do esmalte no geral, a dureza da dentina reduziu após quase todas as doses de irradiação comparada com a dentina controle. As alterações morfológicas tanto de esmalte quanto da dentina aumentaram proporcionalmente com o aumento da dose de radiação, com uma porção interprismáticos mais evidente, presença de fissuras e obliterações dos túbulos dentinários e uma fragmentação progressiva das fibras colágenas.

Em 2014, Mellara *et al.* avaliaram a radioterapia em dentes decíduos. A dureza do esmalte e da dentina (n=12) foi avaliada em 3 profundidades, antes (controle) e após cada 10 Gy de irradiação até uma dose total de 60 Gy. Os dentes decíduos foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de varredura (n=8). Os dados foram analisados por meio da análise de duas variância (ANOVA) e teste de Tukey. A uma radiação de 60 Gy observaram aumento da microdureza do esmalte em relação ao dente não irradiado e a dentina irradiada em doses de 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy. Não houveram diferenças entre esses grupos (irradiado e não irradiado) quanto a microdureza. A microdureza do esmalte

aumentou em uma dose de 60 Gy, enquanto que os valores de dureza da dentina não alteraram. Um rompimento progressivo da morfologia do esmalte e da dentina foi encontrado com o aumento da dose de irradiação.

Em 2015, Reed *et al.* realizaram um estudo para entender a relação de lesões cáries induzidas pela radioterapia, avaliando as propriedades nanomecânicas e químicas do esmalte e da dentina e sua composição química. Secções destes terceiros molares foram expostos a 2 Gy, 5 dias por semana, durante 7 semanas totalizando em 70 Gy no final. Utilizou-se a nonoindentação para avaliar o módulo de elasticidade e a microespectroscopia Raman para avaliar as propriedades químicas. O módulo de elasticidade do esmalte e da dentina aumentou durante a radioterapia e de acordo com a microespectroscopia Raman houve uma redução da relação proteína em virtude ao mineral dental. Após a radioterapia houve mudanças significativas no elemento dental.

Em 2015, Ping Qing *et al.* realizaram um extenso estudo sobre as consequências da radioterapia nos tecidos dentais duros. O objetivo foi avaliar o efeito da radiação gama sobre o comportamento de desgaste do esmalte do dente humano em relação a orientação dos prismas. Foram realizados testes de nanoscratch, perfilometria de superfície e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para analisar o comportamento ao atrito das placas de esmalte, antes e após o tratamento radioterápico. Já a difração de raios-X (DRX) e a espectroscopia infravermelha transformada de Fourier analisaram as alterações cristalográficas e na composição química induzida pela irradiação. A microdureza superficial (SMH) também foi avaliada. Os resultados dessa pesquisa mostraram que a irradiação causa mudanças na morfologia, no coeficientes de atrito e na profundidade e largura remanescentes em cargas. No teste de nanoscratch notou-se uma resistência menor após a irradiação dos dentes, independentemente da orientação dos prismas do esmalte dental. Além disso, a variação do comportamento do desgaste foi intimamente relacionado com mudanças na cristalografia, na composição química e na dureza superficial de do esmalte, mostrando que a irradiação teve direto efeito prejudicial no esmalte do dente humano.

3- OBJETIVO

Avaliar o efeito da radioterapia e aplicação do flúor nas propriedades químicas e mecânicas do esmalte dental que foram submetidas a ciclagem de pH, variando:

I – Irradiação

- a- Não irradiado
- b- Irradiado em umidade relativa
- c- Irradiado com flúor neutro a 2%

II – Desafio cariogênico

- a- Sem desafio cariogênico
- b- Com desafio cariogênico

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Delineamento experimental

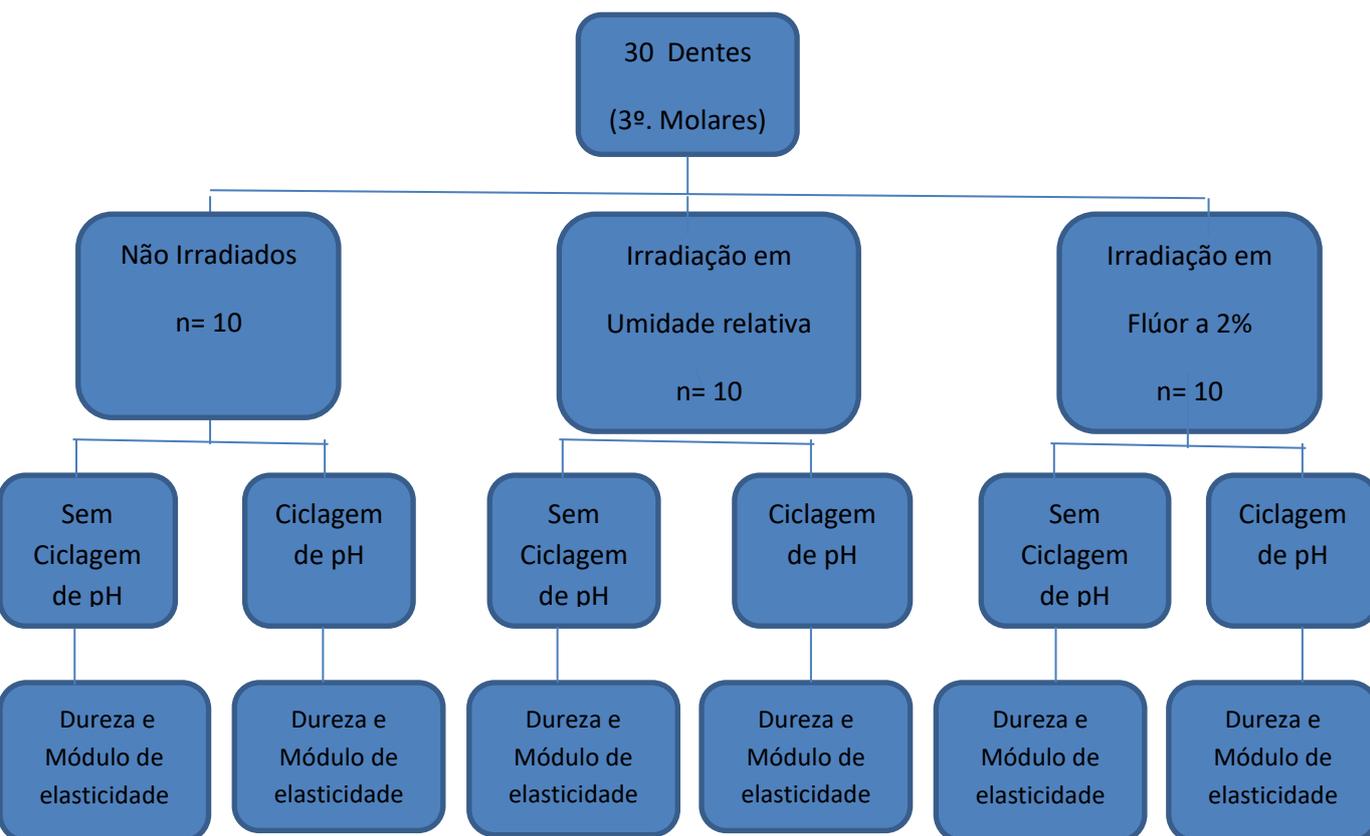
Unidade experimental: Terceiros molares humanos extraídos.

Fator em estudo: Irradiação em três níveis (Não irradiados, irradiados em umidade relativa e irradiado em flúor neutro a 2%), Desafio cariogênico em dois níveis (Sem ciclagem de pH, com ciclagem de pH).

Variável resposta: Composição química do esmalte (Razão Matriz/Mineral – M/M, Conteúdo Relativo de Carbono – CRC); Microdureza Vickers e Módulo de Elasticidade.

Método de análise: Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR) e Microidentação Dinâmica.

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.



4.2- Obtenção, seleção e armazenamento dos dentes

Com a aprovação no comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia (sob o número CAAE: 37868814.6.0000.5152), foram coletados 30 dentes terceiros molares humanos com indicação clínica de exodontia. Os dentes foram coletados nas Clínicas de Cirurgia da FOUFU e no Pronto Socorro Odontológico da Instituição, com prévio consentimento dos pacientes que ficaram cientes do uso nesta pesquisa e assinaram um termo de doação dos dentes. Após a cessão, os dentes foram mantidos em água deionizada. Então, os dentes foram limpos com curetas periodontais para a remoção de eventuais restos orgânicos e cálculos e posteriormente com pedra-pomes livre de flúor (SS White, RJ, Brasil) e água deionizada com o auxílio de escova tipo Robson (KG Sorensen, SP, Brasil) montada em micromotor, em baixa rotação. A seguir com o auxílio de uma lupa estereoscópica foi realizado o exame tátil visual, sendo selecionados os dentes que não apresentaram trincas, fraturas, lesões de cárie ou anomalias de estrutura. Após serem selecionados (Figura 1), os dentes foram aleatoriamente divididos em três grupos (n=10): Não Irradiado; Irradiado em umidade relativa; e Irradiado em flúor neutro a 2%. Dentro de cada grupo, os dentes foram

submetidos em dois subgrupos (n=5) de acordo com a ciclagem de pH: com e sem ciclagem de pH. Os dentes foram armazenados em água deionizada a temperatura de 4°C.



Figura 1 – Padrão dos molares selecionados para o estudo.

4.3 - Irradiação dos dentes

Os dentes dos grupos irradiado em umidade relativa e irradiado em flúor neutro a 2% foram submetidos ao protocolo clínico radioterápico utilizado pelos pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro a partir do equipamento acelerador linear (Acelerador Linear - Clinac 600C Varian® - Feixe de 6 MV) (Figura 2 - A e B). Os dentes eram mantidos em uma temperatura ambiente e submetidos a uma radiação, de 2 Gy de irradiação diária, durante 35 dias, totalizando 70 Gy. (Herchenhorn e Dias *et al.*, 2004).

Os dentes do grupo irradiado em flúor permaneciam no flúor durante o processo de radiação, totalizando 3 minutos, tempo em que o operador realizava aplicação do flúor em todos os dentes do grupo em uma camada de forma padronizada. Após ser feito isso,

os dentes eram submetidos a radiação e logo eram lavados por 10 segundos em água deionizada para a remoção do flúor. Depois, os dentes desse grupo eram submersos em água deionizada até a próxima sessão de radioterapia. Já os dentes irradiados em umidade relativa passavam diretamente pelo processo de radiação e logo eram submersos em água deionizada até a próxima sessão de radioterapia. É válido ressaltar que essa sequência de procedimentos era sempre realizada na mesma ordem para evitar distorções de posteriores resultados.

Para padronizar a posição dos dentes durante a radioterapia, marcações na superfície das compressas (localizadas no interior do recipiente onde os dentes foram irradiados) foram feitas pelo telêmetro, que marca a distância de onde começa a produção de raios X (fonte) até a superfície a ser irradiada (Figura 3). A energia nominal do acelerador é de 6 MV, 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 das compressas. E da superfície das compressas umedecidas até as coroas dos dentes existe uma distância de 1,5 cm (bolus). Dessa forma os raios X foram depositados a máxima quantidade de energia a 1,5 cm da superfície do bolus (100 cm da fonte), coincidindo com a coroa dos dentes. Além disso, para uma distribuição de radiação homogênea para todas as amostras, a radiação foi aplicada em dois campos opostos paralelos à radiação incidente. Ou seja, metade da radiação (1Gy) do feixe de radiação é direcionado de cima para baixo, e posteriormente, a outra metade (1Gy) é direcionado de baixo para a cima. Da mesma forma que acontece com os pacientes submetidos a radioterapia no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.



Figura 2 - Acelerador Linear (Clinac 600C Varian®) utilizado para a irradiação dos dentes. A) Vista lateral do acelerador. B) Vista aproximada do acelerador com recipiente contendo os dentes em posição.



Figura 3 - Telêmetro ao fundo e recipiente com os dentes a serem irradiados abaixo do bolus de compressa umedecida.

4.4- Preparo dos dentes

Os dentes foram inicialmente fixados com cera pegajosa (Kerr Corporation, CA, USA) numa placa de acrílico e posteriormente, seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária, com disco diamantado adaptado em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob-refrigeração 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 seccionada no sentido mesio/distal, obtendo-se duas metades, sendo uma correspondente à hemisseção vestibular e outra a hemisseção lingual ou palatina (Figura 4). As hemisseções vestibulares foram cortadas de forma que ao final obteve-se uma fatia de 1,8mm x 3,0mm x 5,0mm. Esta fatia foi seccionada no sentido vestibúlo-lingual, obtendo-se então dois espécimes, sendo uma designada para o teste de microindentação e outra para o FTIR.

Após o preparo, as amostras foram mantidas em ambiente úmido sob refrigeração, conforme descrito anteriormente.

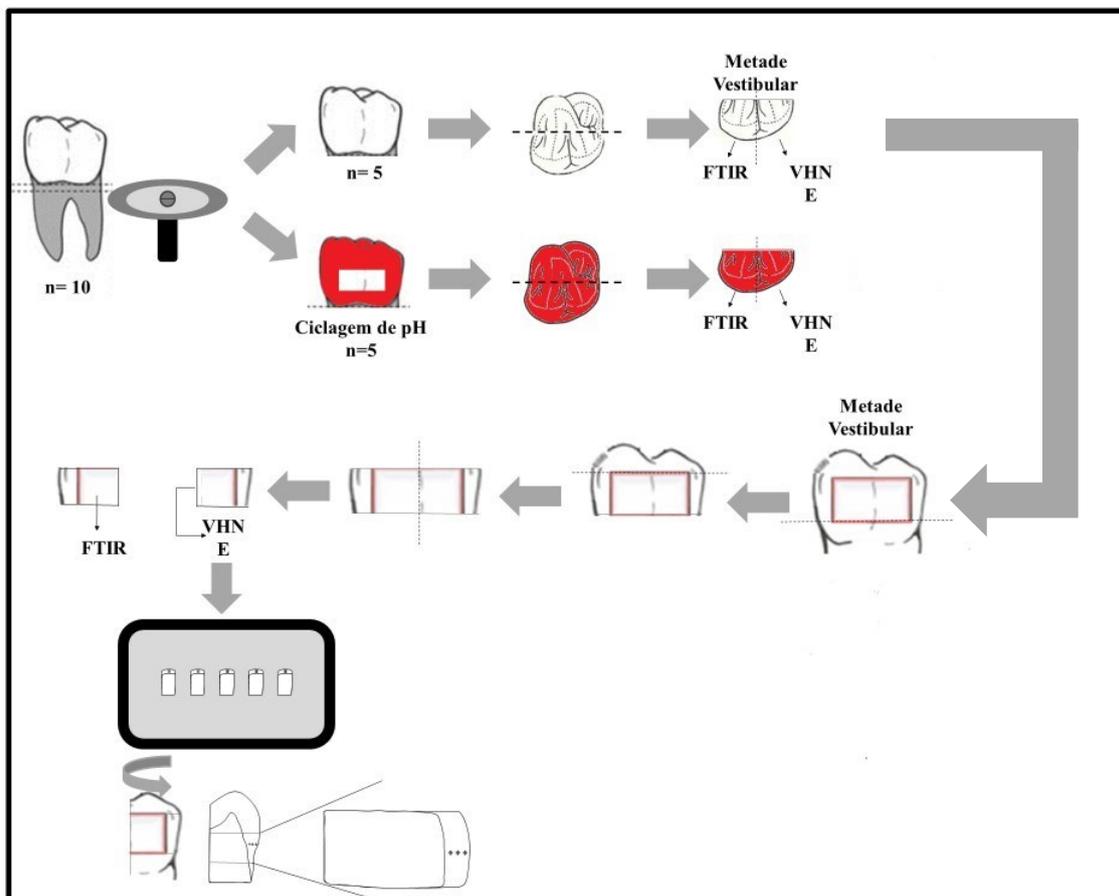


Figura 4: Esquema ilustrativo do preparo dos dentes.

4.5- Processo de ciclagem do pH

Para o desafio cariogênico, os espécimes foram submetidos a uma ciclagem de pH de 14 dias, realizado com 6 horas de desmineralização, seguidos de 18 horas de

remineralização, a 37°C durante todo o experimento, exceto no intervalo de troca das soluções. Nos intervalos entre imersões, todas os espécimes eram lavados em água corrente de água destilada e deionizada por 10 segundos. Este procedimento foi realizado por 14 dias e no final de cada 5 dias consecutivos desse ciclo, as amostras foram mantidas em solução remineralizadora por 2 dias seguidos.

A solução desmineralizadora com pH de 4,3 era constituída de 2,0mM de cálcio, 2,0mM de fosfato em solução tampão de acetato 0,075mM. Já a solução remineralizadora com pH 7,0 era constituída de 1,5mM de cálcio, 0,9mM de fosfato, 150mM de cloreto de potássio (Geraldo Martins *et al.*, 2013).

Levando-se em consideração o diâmetro dos espécimes, nesse ciclo foram utilizados 67,5mL da solução desmineralizadora (1,25ml/mm²) e 33,48mL da solução remineralizadora para esse processo de ciclagem de pH.

4.6 - Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação da composição química do esmalte (5 espécimes de cada grupo), foi realizada por meio do Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Vertex 70 - Bruker, Ettlingen, Alemanha – figura 5) com reflectância total atenuada (ATR).

O espectro de absorção foi adquirido pelo escaneamento de cada espécime 128 vezes ao longo de um intervalo de comprimento de onda de 4.000 a 400 cm⁻¹ com uma resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros foram registrados e analisados com software OPUS 6,5 (Bruker, Ettlingen, Alemanha) (Figura 6 – A). Foi realizado correção da linha de base e normalização pela banda fosfato (1190-702 cm⁻¹) dos espectros (Figura 6 – B).

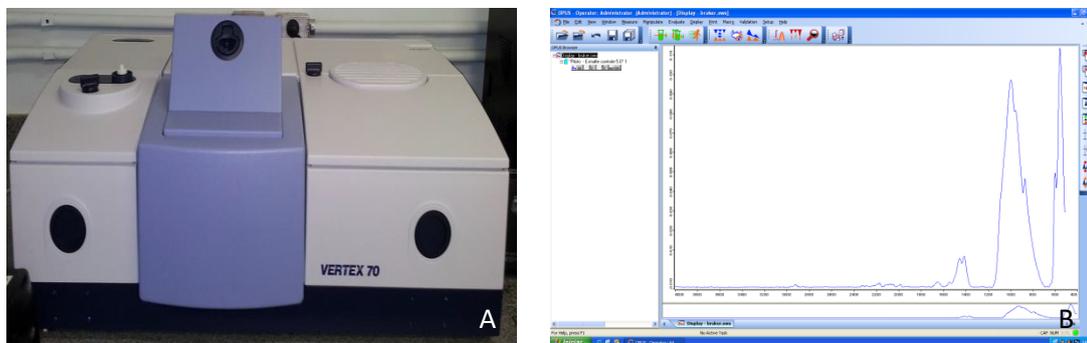


Figura 5 - A) FTIR; B) Software OPUS e espectro de esmalte humano não irradiado.

Os parâmetros analisados foram: Razão Matriz/Mineral (M/M) (a relação entre as áreas integradas das bandas de proteína amida I - 1653 cm^{-1} e v_1 e v_3 de fosfato modo de alongamento - 960 cm^{-1} e 1040 cm^{-1}); Conteúdo relativo de carbonato (CRC) (a 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 cm^{-1} e 568 cm^{-1} (Figura 6) (Sa *et al.*; 2012).

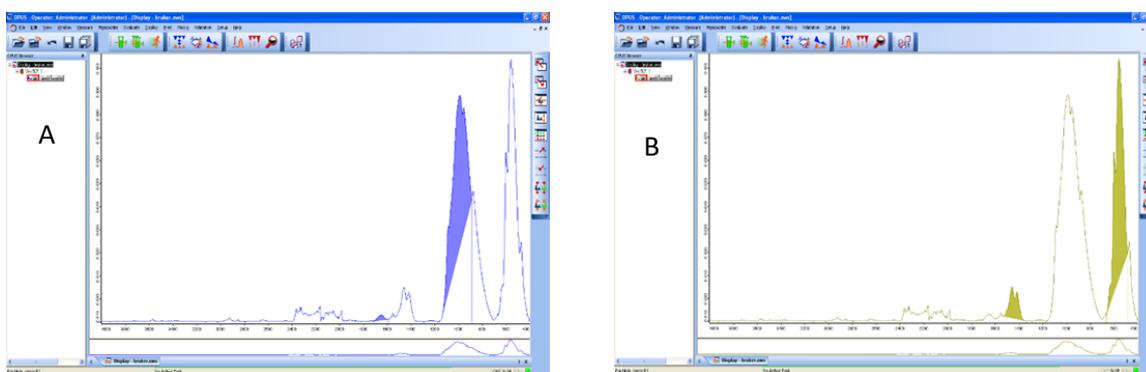


Figura 6 – Análise dos espectros por meio do software OPUS 6.5. **A)** Matriz/Mineral; **B)** CRC.

4.7- Ensaio de Dureza (VHN) e Módulo de elasticidade (E)

Cinco espécimes de cada grupo foram utilizados para a análise das propriedades mecânicas do esmalte irradiado e não irradiado. 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 7).

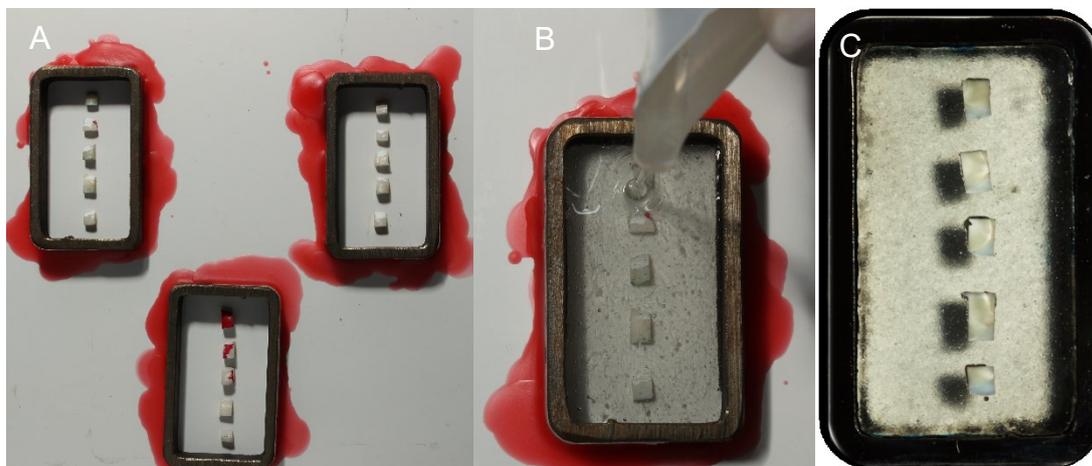


Figura 7 – A) Espécimes de esmalte posicionadas ao centro do metalon; **B)** Vertimento da resina de poliestireno para inclusão dos espécimes; **C)** Espécimes prontas após o polimento.

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 minutos 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 $\frac{1}{4}$ μm - AROTEC, São Paulo, SP, Brasil), em alta velocidade por 5 minutos em cada feltro seguido de 5 minutos 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. 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), do Laboratório de Tecnologia em Atrito e Desgaste da Faculdade de Engenharia Mecânica da UFU (Figura 8 – A e B). O penetrador do aparelho foi colocado em três regiões diferentes do esmalte: a primeira a 40 μm a partir da sua borda exterior (esmalte superficial), a segunda a uma metade da espessura do esmalte (esmalte médio), e o terceiro a 40 μm a partir da junção amelodentinária (esmalte profundo) para determinar o número de dureza Vickers (VHN) em diferentes profundidades (de Siqueira

Mellara, 2014) (Figura 9). 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 segundos, sendo o carregamento máximo de 500mN mantido por 15 segundos. 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).

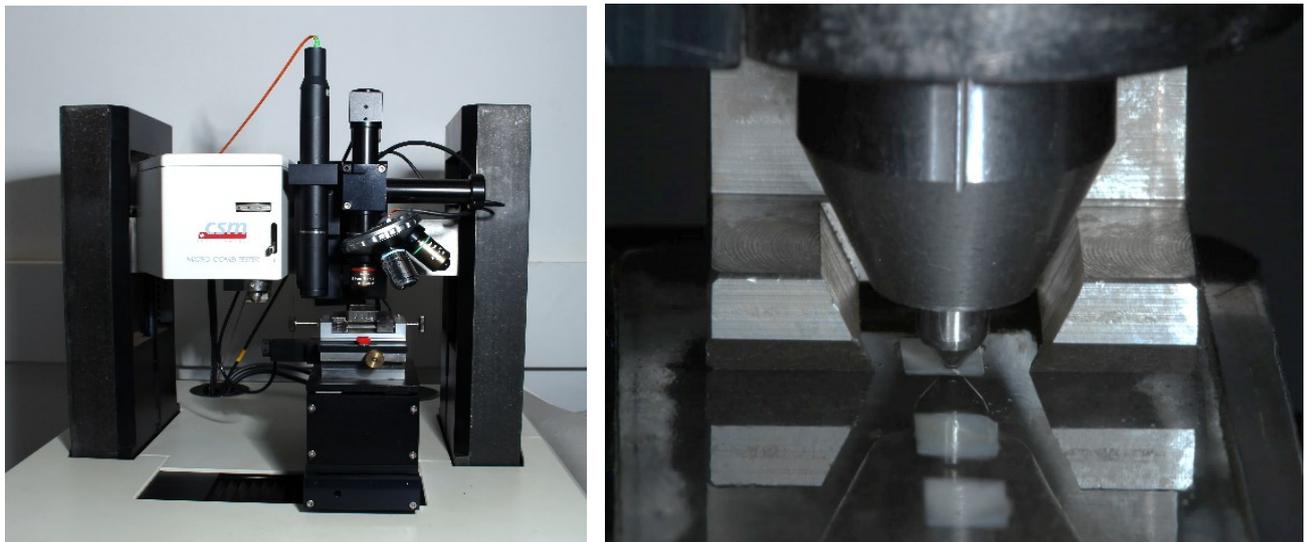


Figura 8 - A) Microindentador dinâmico utilizado. **B)** Visão aproximada da ponta de diamante do indentador no esmalte.

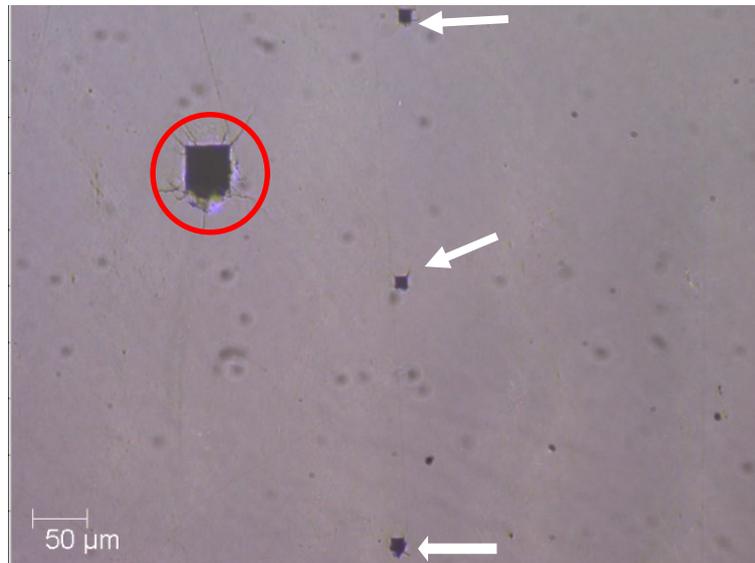


Figura 9 - Imagem das indentações realizadas no esmalte superficial, médio e profundo, indicados pelas setas. A indentação maior é realizada primeiramente para calibração do aparelho (círculo vermelho).

4.8- 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 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 $p < 0,05$ e todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico SigmaPlot® Sistema versão 12.0 (Systat Institute Inc., de San Jose, CA, EUA).

5 - RESULTADOS

5.1 Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR)

Com relação aos espectros dos diferentes grupos: NI, IU e IF, com a ciclagem e sem a ciclagem de pH, podem ser observados na figura 10 (A e B respectivamente). Nesta figura, observa-se que ocorreu a manutenção das principais bandas, e sem a ciclagem de pH, os espectros estão praticamente sobrepostos um ao outro, exceto na banda de amida I, que nota-se uma banda de intensidade menor no grupo IF. Já após a ciclagem de pH ocorre um aumento do conteúdo matriz orgânica, mas sendo menos evidenciado no IF. Além disso após a ciclagem nota-se perda de intensidade das bandas CO_3^{2-} ; e ganho de intensidade das bandas ν_3 e ν_4 PO_4^{3-} .

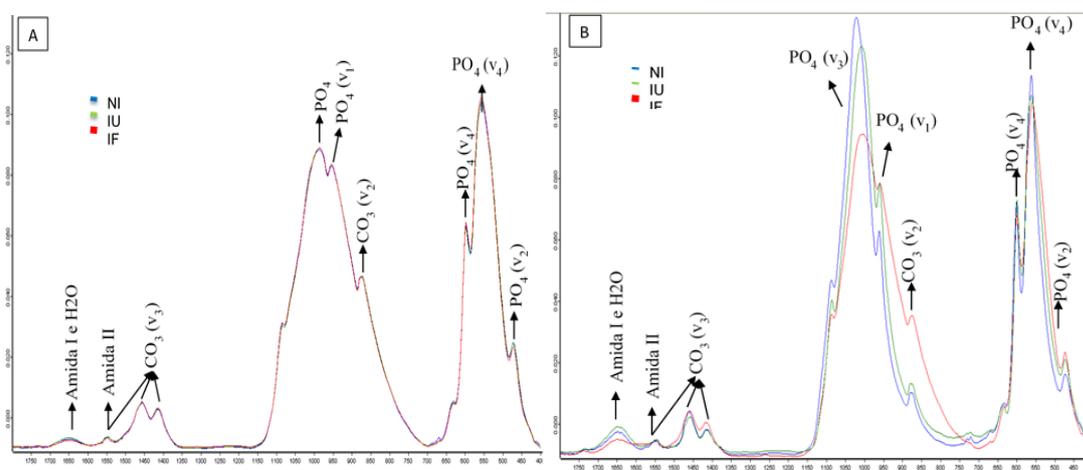


Figura 10. Espectros dos grupos e experimentais, sem ciclagem de pH (A) e depois da ciclagem de pH (B), respectivamente.

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.

Tabela 4 - Média e desvio padrão (\pm) para M/ M, CRC do esmalte comparando tipo de irradiação e ciclagem de pH.

Irradiação	M:M		CRC	
	Sem ciclagem de pH	Ciclagem de pH	Sem ciclagem de pH	Ciclagem de pH
NI	0,017	0,027	0,179	0,146
	$\pm 0,004$	$\pm 0,001$	$\pm 0,051$	$\pm 0,016$
	Bab	Aa	Aa	Ba
IU	0,020	0,026	0,186	0,116
	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,019$	$\pm 0,022$
	Ba	Aa	Aa	Ba
IF	0,013	0,011	0,176	0,149
	$\pm 0,004$	$\pm 0,002$	$\pm 0,010$	$\pm 0,015$
	Ab	Ab	Aa	Ba

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

5.2 – *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. Médias (MPa) e Desvio-Padrão de (\pm) para VHN (N/mm^2) 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		619,7 \pm 139,5	
	Médio	466,2 \pm 103,3	453,0 \pm 102,9 B	613,6 \pm 122,1	625,1 \pm 151,9 A
	Profundo	406,1 \pm 102,5		642,0 \pm 194,0	
IU	Superficial	608,0 \pm 72,9		676,2 \pm 68,2	
	Médio	512,1 \pm 79,2	423,9 \pm 71,6 B	561,4 \pm 60,2	589,7 \pm 59,9 A
	Profundo	454,8 \pm 62,6		531,5 \pm 51,2	
IF	Superficial	489,3 \pm 37,8		606,9 \pm 202,8	
	Médio	469,1 \pm 28,1	479,3 \pm 43,1 B	563,1 \pm 178,2	582,3 \pm 192,7 A
	Profundo	479,6 \pm 63,3		576,9 \pm 197,0	

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

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

6 - DISCUSSÃO

A hipótese nula gerada neste trabalho foi rejeitada, pois a radiação gerada pelo acelerador linear alterou a composição química e as propriedades mecânicas do esmalte dental. Sabe-se que a radioterapia é uma forma terapêutica amplamente utilizada para o tratamento de neoplasias, de forma exclusiva ou associada à cirurgia e à quimioterapia (Dobbs *et al.*, 1999; Kielbassa *et al.*, 2006; Lazarus *et al.*, 2007).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, o princípio do procedimento é basicamente a utilização de radiações ionizantes que podem ser eletromagnéticas ou corpusculares e 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. Nesse processo átomos são quebrados e as estruturas das moléculas químicas podem ser alteradas, no sentido de destruir as células quando realizarem a proliferação celular.

Na prática terapêutica, uma dose pré-calculada de radiação é aplicada em determinado tempo ao tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células

tumorais. Espera-se menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada. Para que o efeito biológico atinja maior número de células neoplásicas e a tolerância dos tecidos normais seja respeitada, a dose total de radiação a ser administrada é habitualmente fracionada em doses diárias iguais, quando se usa a terapia externa (Pro-Onco *et al.*, 1993).

Embora o tratamento de pacientes com câncer de cabeça ou pescoço com a radioterapia, seja uma forma não invasiva, visando menores danos possíveis ao paciente oncológicos, é possível observar algumas alterações clínicas decorrentes da radiação. Dentre elas estão: mucosite, hipossalivação, perda de paladar, osteorradiocrose, cárie de radiação e trismo, bem como o desenvolvimento de anormalidades dentais e maxilofaciais em pacientes pediátricos, que podem acontecer devido à exposição a altas doses afetando a cavidade bucal, maxila, mandíbula e glândulas salivares (Vissink *et al.*, 2003; Jham e Freire *et al.*, 2006).

Além disso, são frequentemente observadas cáries por irradiação que se desenvolvem rapidamente e são consideradas formas altamente destrutivas de cárie (Jongebloed *et al.*, 1988; Kielbassa *et al.*, 2006). Com a irradiação, ocorre alterações do ambiente oral, ocorrendo alterações gustatórias e dietéticas levando a preferência por alimentos macios e ricos em carboidratos (Mekhail *et al.*, 2001), queda no pH, dificuldades de higienização e alterações nas glândulas salivares, que causam a hipossalivação, alterando assim o fluxo e a composição da saliva que altera o comportamento da flora bacteriana presente na cavidade oral, tornam o meio oral desses pacientes altamente cariogênico (Kielbassa *et al.*, 1997; Vissink, *et al.*, 2003). Portanto diante das consequências geradas pela radioterapia, é necessário estudo para analisar se a irradiação é capaz de alterar a composição química e as propriedades mecânicas do esmalte. Sendo um dos fatores de estudo, o flúor, avaliando se sua ação minimizaria os efeitos da radiação nos elementos dentais. Mas para a compreensão detalhada deste estudo, é necessário compreender a microestrutura do esmalte dental.

O esmalte dental, estrutura que recobre a coroa dos dentes, é o tecido mais mineralizado do nosso organismo, formado por células epiteliais originados do ectoderma. Além disso, quando totalmente formado e após a erupção do dente, é o único tecido mineralizado completamente acelular, ou seja, é o único tecido que não mantém relação com as células que o formaram. O esmalte é altamente inorgânico, sendo em torno de 97% de porção inorgânica, 1% orgânica e 2% de água. Dentre essa porção inorgânica é composto de cristais de fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita, carbono, sódio,

magnésio, cloreto, potássio e flúor. Já a parte orgânica é constituído basicamente de proteínas. É por essa razão que o esmalte é um tecido duro, altamente friável e suportado pela dentina, caso não houvesse a dentina o esmalte se quebraria pela baixa resistência, desta forma, a dentina, um tecido subjacente, é mais resiliente, atua na sustentação do esmalte e reduz a possibilidade de fratura durante os processos de mastigação. O esmalte é de natureza cristalina, portanto é translúcido e sua morfologia é basicamente constituída de uma estrutura prismática que se estende desde a dentina até a superfície do esmalte. (Eduardo Katchburian e Victor Arana *et al.*, 2012).

A cárie dental é um processo destrutivo dos tecidos mineralizados devido à ação da placa bacteriana na cavidade oral e pode ser descrita como um processo de desmineralização e remineralização dos tecidos (Larsen e Brun *et al.*, 1995). O processo cariioso ocorre decorrido devido ao desequilíbrio do pH bucal, o ideal seria um pH neutro ou mais básico, mas com o passar do dia, ao nos alimentarmos, a boca tende a alterar seu pH, sendo o pH ácido favorável para o processo cariioso. Para facilitar o entendimento, é necessário compreender o mecanismo desse processo que é chamado DES x RE, onde ocorre desmineralização e remineralização constantemente no meio bucal.



Essa via está em constantes transformações, podendo estar deslocada para a direita ou esquerda

A cárie envolve a dissolução da fase mineral, principalmente dos de cristais de hidroxiapatita, por ácidos produzidos pela fermentação bacteriana (Newbrun *et al.*, 1982). É uma doença multifatorial, sendo relacionada com a queda do pH, saliva, radiação, etc. Portanto sua progressão será determinada pelas perdas de mineral, a princípio do esmalte dental, que irá favorecer para o surgimento ou não de cavidades cariosas (Gonçalves *et al.*, 2003).

Sabendo que pacientes com xerostomia possuem maiores chances de desenvolver a cárie, compreendemos que o fator de estudo desse trabalho que é irradiação pode estar diretamente relacionado com pacientes oncológicos e que realizam tratamento radioterápico.

Nesse contexto entra o flúor, que até então é considerado como um elemento que poderia influenciar, minimizando os efeitos da cárie. O flúor, é um mineral que combinado ao esmalte dental atua de várias formas, dentre elas: inibindo o metabolismo bacteriano após sua difusão para o interior da bactéria, como moléculas de ácido fluorídrico; inibindo a desmineralização, por meio da formação de cristais tipo fluoreto de cálcio (CaF_2) que se depositam na superfície; tendo potencial de remineralização em áreas desmineralizadas (Cury *et al.*, 2001). É válido ressaltar que esse processo está em constantes transformações e é influenciado pelo pH, mas sem dúvidas nenhuma, o flúor atua no sentido inverso da reação, tentando deixar o pH mais alto, desta forma remineralizando o esmalte. O flúor substitui as hidroxilas originando hidroxiapatitas fluoretadas. Quando o flúor é incorporado, ele promove aumento no tamanho e espessura nos cristais de hidroxiapatita, diminuindo assim a solubilidade desses cristais de hidroxiapatita (Groeneveld *et al.*, 1990).

Neste estudo, foi feita análise com Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR), a fim de avaliar as mudanças químicas que a irradiação poderia causar na estrutura do esmalte. A Espectroscopia por FTIR é um ensaio não destrutivo que avalia mudanças químicas ocorridas sobre a superfície dos tecidos dentais, sendo avaliadas nessa pesquisa: Razão Matriz/Mineral (M/M) e o Conteúdo relativo de carbonato (CRC) das amostras dos diferentes grupos.

Foi feita a análise da parte orgânica, já que sabemos que com a radiação essas ligações que o esmalte possui são alteradas. As amostras dos grupos foram interpretadas através de bandas que são as alterações de picos que o programa do Software OPUS oferece.

A Razão Matriz/Mineral (M/M) é a relação da matriz orgânica em relação à matriz inorgânica. A matriz orgânica influencia a quantidade, a qualidade e a distribuição dos cristais minerais, e que pode alterar a arquitetura hierárquica do esmalte e afetar suas propriedades mecânicas (Sa *et al.*, 2014). O grupo IF sem a ciclagem apresentou os menores valores da razão M/M, desta forma conclui-se que os íons fluoreto substituíram os íons hidroxilas na hidroxiapatita, diminuindo o espaço preenchido pela matriz orgânica (Soares *et al.*, 2010). Esse mesmo grupo após a ciclagem manteve os valores da razão M/M semelhante à antes do processo de ciclagem. Evidenciando que com o flúor ocorre menor queda de pH, diminuindo a solubilidade do esmalte dental (Ten Cate *et al.*, 1999). Já nos grupos NI e IU, com a ciclagem do pH ocorreu um aumento da a razão M/M, desta

forma ocorreu uma dissolução superficial do conteúdo mineral do esmalte proveniente do contato com ácidos da solução desmineralizadora, expondo mais matriz orgânica.

O Conteúdo relativo de carbonato (CRC), indica a quantidade do conteúdo de carbonato presente no esmalte dos diferentes grupos avaliados no estudo. O carbonato confere uma maior solubilidade e instabilidade ao esmalte (Xu *et al.*, 2012). De acordo com os resultados, não houve diferenças significativas entre grupos que passaram pelo protocolo radioterápico. Mas após a ciclagem de pH, ou seja, após ser mantido em um meio ácido, o grupo NI e IU teve quedas consideráveis do CRC, ocorrendo uma diminuição do conteúdo de carbonato e aumento do conteúdo de fosfato.

Com esse resultado, conclui-se que de fato 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 *et al.*, 1999). E quando ocorre a remineralização temos a inclusão do íon fosfato. Os grupos NI e IU passando pela ciclagem de pH possuíam 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. Comprovando então, que o grupo IF teve uma maior integridade do conteúdo mineral, sendo o flúor eficaz para uma maior proteção da estrutura do esmalte.

Além da composição química, foram analisados também as propriedades mecânicas. As propriedades mecânicas do esmalte foram avaliadas por teste de indentação dinâmico, que permite a determinação tanto do módulo de elasticidade como da microdureza Vickers do esmalte.

O módulo de elasticidade (E) representa a rigidez de um material (Zhang *et al.*, 2014). Quanto menor o módulo de elasticidade, menos rígido será o material e maior é a sua capacidade de recuperação elástica (Kinney *et al.*, 2003). Já a microdureza mensura a resistência do esmalte à deformação (Kinney *et al.*, 2003; Zhang *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 *et al.*, 1982) e é capaz de degradar fibrilas colágenas da dentina (Fisher *et al.*, 1971; Pioch *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2011; 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2014). O material orgânico neste tecido permite uma melhor distribuição de cargas entre os prismas (Ten Cate *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 1990; Ten Cate *et al.*, 2015), ratificando o aumento da microdureza.

A análise da profundidade do esmalte realizada neste estudo, não apresentou 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, demonstrando seu efeito anticariogênico (Cury *et al.*, 2001).

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.

7- CONCLUSÕES:

Baseado nos resultados deste estudo *in vitro*, pode-se concluir 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 do 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.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALMSTAHL A, WIKSTROM M. Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. Archives of Oral Biology. 2003.337-344.

- 2- ANDREWS N, GRIFFITHS C. Dental complications of head and neck radiotherap. Australian Dental Journal. 2001.88-94.
- 3- ANNEROTH G, HOLM L.E, KARLSSON G. The effect of radiation to the teeth. International Journal of Oral Surgery. 1985.269–274.
- 4- AOBA T, TAKAHASHI J, YAGI T, DOI Y, OKAZAKI M, MORIWAKI Y. High-voltage electron microscopy of radiation damages in octacalciumphosphate. Journal of Dental Research. 1981.954–959.
- 5- BALDASSARRI M, MARGOLIS H.C, BENIASH E. Compositional determinants of mechanical properties of enamel. Journal of Dental Research. 2008.645-649
- 6- BAKER D.G. The radiobiological basis for tissue reactions in the oral cavity following therapeutic x-irradiation. A review. Archives of Otolaryngology.1982.21-4.
- 7- BEECH N, ROBINSON S, PORCEDDU S, BATSTONE M. Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. Australian Dental Journal. 2014.20–28.
- 8- BEN H.A , GUTMAN D, SZARGEL R, LAUFER D. Effects of irradiation on saliva in cancer patients. International Journal of Oral Surgery. 1975.205-210.
- 9- BEUMER J, CURTIS T.H.A, MARUNICK M.T. Maxillofacial rehabilitation, prosthodontic and surgical considerations, Medico Dental Media International. 1996.43–71.
- 10- BICALHO A.A, PEREIRA R.D, ZANATTA R.F, FRANCO S.D, TANTBIROJN D, VERSLUIS A. Incremental Filling Technique and Composite Material—Part I: Cuspal Deformation, Bond Strength, and Physical Properties. Operative Dentistry. 2014.39
- 11- BROWN L.R, DREIZEN S, HANDLER S, JOHNSTON D.A. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. Journal of Dental Research. 1975.740–750.
- 12- CACCELLI E.M.N, RAPOPORT A. Para efeito das irradiações nas neoplasias de boca e orofaringe. Revista Brasileiro de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. 2008.198-201.

- 13- CAIELLI C, MARTHA P.M, DIB L.L. Sequelas orais da radioterapia: atuação da odontologia na prevenção e tratamento. *Revista Brasileira Cancerologia*. 1995.231-241.
- 14- CHEUNG D.T, PERELMAN N, TONG D, NIMNI M.E. The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1990.581–589.
- 15- CHITRA S, SHYAMALA DEVI C.S. Effects of radiation and alphotocopherol on saliva flow rate, amylase activity, total protein and electrolyte levels in oral cavity cancer. *Indian Journal of Dental Research*. 2008.213-218.
- 16- CLIFTON M.C. Focus on Fluorides: Update on the Use of Fluoride for the Prevention of Dental Caries. *Journal of Evidence Based Dental Practice*. 2014.95–102.
- 17- CONGER A.D. Loss and recovery of taste acuity in patients irradiated to the oral cavity. *Radiation Research*.1973.338-347.
- 18- CONTROLE DO CÂNCER: uma proposta de integração ensino serviço. *Revista atual da 2 edição-Rio de Janeiro: Pro-Onco*. 1993.
- 19- CURY J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri L.N. *Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades*. São Paulo: Editora Santos; 2001.33-68.
- 20- CUY J.L, MANN A.B, LIVI K.J, TEAFORD M.F, WEIHS T.P. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology*. 2002.281-91.
- 21- DAMATO F.A, STRANG R, STEPHEN K.W. Comparison of solution- and gel-prepared enamel lesions—an in vitro pH-cycling study. *Journal of Dental Research*. 1988.1122-1125.
- 22- DAVIS W.B. Reduction in dentin wear resistance by irradiation and effects of storage in aqueous media. *Journal of Dental Research*. 1975.1078–1081.

- 23- DENHAM J.W, PETERS L.J, JOHANSEN J, POULSEN M, LAMB D.S, HINDLEY A. Do acute mucosal reactions lead to consequential late reactions in patients with head and neck cancer. *Radiotherapy and Oncology*. 1999.157–164.
- 24- DOBBS J, BARRETT A, ASH D. *Practical radiotherapy planning*. London: Arnold. 1999.
- 25- EFEOGLU N, WOOD D, EFEOGLU C . Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. *Journal of Dentistry*. 2005.561-567.
- 26- ENEROTH C.M, HENRIKSON C.O, JAKOBSSON P.A. Pre-irradiation qualities of a parotid gland predicting the grade of functional disturbance by radiotherapy. *Acta Otolaryngologica*. 1972.436-444.
- 27- 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.
- 28- FANG Y.Z, YANG S, WU G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 2012.827-9.
- 29- FEATHERSTONE J.D.B, GLENA R, SHARIATI M, SHIELDS C.P. Dependence of *in vitro* demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *Journal of Dental Research*. 1990.620-625.
- 30- FEATHERSTONE J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1999.31–40.
- 31- FEATHERSTONE J.D.B, FRIED D, DUHN C. Surface dissolution kinetics of dental hard tissue irradiated over a fluence range of 1-8 (J/cm^2) at a wavelength of 9.3 mm. *SPIE proceedings Lasers in Dentistry*. 1998.146-151.
- 32- FEATHERSTONE J.D.B, OREILLY M.M, SHARIATI M, BRUGLER S. Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: Leach SA. *Factors affecting de- and remineralization of the teeth*. 1986.23-34.

- 33- FISHER B.V, MORGAN R.E, PHILLIPS G.O, WARDALE H.W. Radiation damage in calcium phosphates and collagen: an interpretation of ESR spectra. *Radiat Res.* 1971.229-35
- 34- FRÄNZEL W, GERLACH R, HEIN H.J, SCHALLER H.G. Effect of tumor therapeutic irradiation on the mechanical properties of teeth tissue. *Zeitschrift Fur Medizinische Physik.* 2006.148-154.
- 35- Herchenhorn D, Dias L.F. Avanços no tratamento quimioterápico e radioterápico do câncer de cabeça e pescoço. Departamento de Oncologia Clínica e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Instituto Nacional de Câncer - Rio de Janeiro. *Revista do Hospital de clínicas.* 2004.
- 36- MARTINS G.V.R, LEPRI C.P, PALMA-DIBB R.G. Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. *Lasers in Medical Science.* 2013.33-39.
- 37- GONÇALVES L.M.N, DIBB R.G.P, SILVA F.W.G.P, OLIVEIRA H.F, FILHO P.N, SILVA L.A.B, QUEIROZ A.M. Queiroz. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth . *Journal of dentistry.* 2014. 986-92.
- 38- GROENEVELD, A; VAN ECK, AAMJ; BACKER DIRKS, O. Fluoride in caries prevention. Is the effect pre- or post-eruptive. *Journal of Dental Research.* 1990.751-5
- 39- HAMBA H, NIKAIDO T, INOUEA G, SADR A, TAGAMI J . Effects of CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: A quantitative assessment using micro-computed tomography. *Journal of Dentistry.* 2011.405-413
- 40- JANSMA J, BUSKES J.A, VISSINK A, MEHTA D.M, GRAVENMADE E.J. The effect of X-ray irradiation on the demineralization of bovine dental enamel. A constant composition study. *Caries Research.* 1988.199-203.
- 41- JHAM B.C, FREIRE A.R.S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.* 2006. Vol.72 no.5.
- 42- EDUARDO KATCBURIAN, VICTOR ARANA. *Histologia e embriologia oral: Texto, atlas, correlações clínicas.* 2012.171-203.
- 43- KIELBASSA A.M, HINKELBEIN W, HELLWIG E, MEYER-LÜCKEL H.

Radiat-relat Damage Dentition. *The Lancet Oncology*. 2006.326–335.

44- KIELBASSA A.M. Radiotherapy of the Head and Neck. Implications for Dentists, Ear-Nose-Throat Physicians, and Radiologists. 2004.59–69.

45- KINNEY J.H, MARSHALL S.J E MARSHALL G.W. The Mechanical Properties of Human Dentin: A Critical Review and Re- evaluation of the Dental Literature. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2003.13-29.

46- LARSEN M.J, BRUN C. Enamel/saliva – inorganic chemical reaction.In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Textbook of Cariology*. 1986.181-203.

47- LAZARUS C, LOGEMAN J.A, PALOUSKI B.R, RADENAKER A.W, HELENOSWISKI I.B, VONESH E.F. Effects of radiotherapy with or without chemotherapy on tongue strength and swallowing in patients oral cancer. 2007.632-637.

48- MARGOLIS H.C, MORENO E.C. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. *Journal of Dental Research*. 1990.606-13.

49- MARTINS G.V.R, LEPRI C.P, PALMA-DIBB R.G. Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. *Lasers in Medical Science*.. 2013.33-39.

50- MEKHAIL T.M, ADELSTEIN D.J, RYBICKI L.A. Enteral nutrition during the treatment of head and neck carcinoma. Is a percutaneous endoscopic gastrostomy tube preferable to a nasogastric tube. *Cancer* 2001.85-90.

51- MELLARA T.S, DIBB R.G.P, OLIVEIRA H.F, SILVA F. W. G. P, FILHO P.N, SILVA R. A. B, SILVA L. A.B, QUEIROZ A.M. The effect of radiation therapy on the mechanical And morphological properties of the enamel and Dentin of deciduous teeth— an in vitro study. *Radiation Oncology* 2014, 9:30.

52- NAIMA OTMANI. Oral and Maxillofacial Side Effects of Radiation Therapy on Children *Journal of the Canadian Dental Association*. 2007.257-261.

53- NEWBRUN E. Sugar and dental caries. *Clinical Preventive Dentistry*. 1982.11-14.

54- NOTANI K , YAMAZAKI Y , KITADA H , SAKAKIBARA N , FUKUDA H , OMORI K , NAKAMURA M. Management of mandibular osteoradionecrosis

corresponding to the severity of osteoradionecrosis and the method of radiotherapy. Journal Article. 2003.181-186.

55- PIOCH T, MOLLER D, STAEHLE H.J, HOPPE W. Solubility of enamel and synthetic hydroxylapatite on irradiation. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. 1991.413–415.

56- QING P, SHENGBIN H, GAO S, QIAN L, H. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth enamel. Scientific Reports. 2015

57- REED R, XU C, LIU Y, GORSKI J.P, WANG Y, WALKER M.P. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. Archives of Oral Biology. 2015.690 – 697.

58- SA Y, LIANG S, MA X, LU S, WANG Z, JIANG T. Compositional, structural and mechanical comparisons of normal enamel and hypomaturation enamel. Acta Biomaterialia . 2014.77.

59- SANTIN G.C. 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.

60- SILVA A.R.S, ALVES F.A, ANTUNES A, GOES M.F, LOPES M.A. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation related caries. Caries Research. 2009.43–49.

61- SOARES C.J, NEIVA N.A, SOARES P.B, DECHICHI P, NOVAIS V.R, NAVES L.Z. Effects of chlorhexidine and fluoride on irradiated enamel and dentin. Journal of Dental Research 2011.659–64.

62- SOONS J,A, AERNOUTS J, DIRCKX J.J. Elasticity modulus of rabbit middle ear ossicles determined by a novel micro-indentation technique. Hear Res 2010.33-37.

63- SPECHT L. Oral complications in the head and neck irradiated patient. Introduction and scope of the problem. Supportive Care in Cancer. 2002.36-39.

64-TAKAHASHI N E NYVAD B. The Role of Bacteria in the Caries Process. Journal of Dental Research. 2001. 294-303.58-

65- TEN CATE J. M. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand.* 1999.325-9.

66- TEN CATE J.M. Models and role models. *Caries Research.* 2015.3-1061- TEN CATE J.M. Oral histology: development, structure and function. 1994.400.

67-THOMSON W.M. Measuring change in dry-mouth symptoms over time using the Xerostomia Inventory. *Gerodontology* 2007.30–35

68- VISSINK A, JANSMA J, SPIJKERVET F.K.L, BURLAGE F.R, COPPES R.P. Oral e sequelae of head and neck radiotherapy. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 2003.199–212.

69- XU C, REED R, GORSKI J.P, WANG Y, WALKER M.P. The Distribution of Carbonate in Enamel and its Correlation with Structure and Mechanical Properties. *Journal of Materials Science.* 2012;47(23):8035-43.

70- WALKER M.P, WICHMAN B, CHENG A.L, COSTER J, WILLIAMS K.B. Impact of radiotherapy dose on dentition breakdown in head and neck cancer patients, author manuscript. *Practical Radiation Oncology.* 2001.142–148.

71- WEFEL J.S. Effects of Fluoride on Caries Development and Progression Using Intraoral Models. *Journal of Dental Research.* 1990.626-33

72- WHITE D.J. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Advances in Dental Research.* 1995.175-93.

73- ZHANG Y.R, DU W, ZHOU X.D, YU H.Y. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *International Journal of Oral Science* 2014.61-9.

Anexo



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da terapia laser-flúor 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; 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

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: 1.112.000

mudanças adversas na cavidade oral (Specht, 2002; Kielbassa 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; Kielbassa 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; Kielbassa 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 (Osailan 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; Kielbassa et al., 1999; Pioch et al., 1991), diminuindo suas propriedades mecânicas (Kielbassa et al., 1999) e sua resistência ao desgaste (Jervoe, 1970) e reduzindo a sua 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; 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; 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). Também observa-se uma redução da resistência à tração devido a alterações no componente da proteína deste substrato (Soares 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 (Wen, 1989; Shannon et al., 1978), outros descrevem uma

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: 1.112.000

maior solubilidade após irradiação (Jansma et al., 1988; Joyston-Bechal, 1985), ou até mesmo um ligeiro decréscimo na solubilidade (Pioch et al., 1991). No entanto, alterações importantes de radioterapia em dentina são devidas a danos das fibrilas 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 (Pioch, 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, 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. 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 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: 1.112.000

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 méseo/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 "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: 1.112.000

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 hemisseções de cada grupo e o desafio ácido será realizado após a aplicação das terapias.

Objetivo específico 2: Avaliar a influência de diferentes tratamentos na remineralização do esmalte de dentes submetidos ao tratamento radioterápico. Nesta segunda parte do trabalho, também serão utilizadas 30 hemisseções de cada grupo, porém o processo de desmineralização-rem mineralização será realizado anteriormente as terapias. Todas as hemisseções serão submetidas às seguintes avaliações: - 5 hemisseções de cada grupo serão levadas ao Micro-CT para avaliação do perfil mineral; - 5 hemisseções de cada grupo serão avaliadas por meio de microscópio eletrônico de varredura; - 5 hemisseções dos grupos serão avaliadas por meio de microscopia confocal a laser (Microscópio invertido Confocal LSM 510 Meta); - 5 hemisseções de cada grupo serão utilizados para avaliação química por meio de Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (Vertex 70, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA). - 5 hemisseções 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 hemisseções 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 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: 1.112.000

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 Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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: 1.112.000

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).

UBERLANDIA, 17 de Junho 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:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

