Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social

**EFEITO DA RADIOTERAPIA SOBRE AS PROPRIEDADES
MECÂNICAS, QUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DO ESMALTE E DA
DENTINA DE DENTES PERMANENTES – ESTUDO *IN VITRO***

Ligia Maria Napolitano Gonçalves

Ribeirão Preto
2012

Ligia Maria Napolitano Gonçalves

**EFEITO DA RADIOTERAPIA SOBRE AS PROPRIEDADES
MECÂNICAS, QUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DO ESMALTE E DA
DENTINA DE DENTES PERMANENTES – ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de
Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Lígia Maria Napolitano

Efeito da radioterapia sobre as propriedades mecânicas, químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes – Estudo *in vitro*. Ribeirão Preto, 2012.

84p: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Queiroz, Alexandra Mussolino de

1. Radioterapia 2. Cobalto-60 3. Dentes permanentes 4. Microdureza 5. Microscopia eletrônica de varredura 6. Espectroscopia de energia dispersiva de raios X

Ligia Maria Napolitano Gonçalves

**EFEITO DA RADIOTERAPIA SOBRE AS PROPRIEDADES
MECÂNICAS, QUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DO ESMALTE E DA
DENTINA DE DENTES PERMANENTES – ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área
de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

Ligia Maria Napolitano Gonçalves

Nascimento	27 de julho de 1971 – São Paulo, São Paulo
Filiação	Antonio Napolitano Neto Aracy Galhardo dos Reis Napolitano
1991-1994	Curso de Graduação Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP
1998-1999	Especialização em Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Bauru/USP
2010-2012	Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP

Dedico este trabalho

A *Deus*, que está presente em todos os momentos da minha vida, desde o início deste sonho me dando sabedoria, força e não me deixando desanimar nos momentos mais difíceis. Obrigado por existir com tanta intensidade em meu coração.

Aos meus pais *Antonio Napolitano Neto* e *Aracy Galhardo dos Reis Napolitano*, por serem os dois grandes pilares da minha vida. Pelo amor incondicional e por todo o apoio que me deram nesses anos. Pelos ensinamentos e exemplo de vida. Pelo incentivo, dedicação e pela fé que depositaram em mim. Simplesmente eu os amo e esta conquista é tanto minha como de vocês.

Ao grande amor da minha vida, *Paulo César Tiburcio Gonçalves*, pelo incentivo, amor e força. Agradeço pelo seu amor, por entender e aceitar meus anseios e objetivos de vida, pelos nossos filhos e por fazer parte da minha vida. Te amo muito.

Aos meus filhos *Paula Napolitano Gonçalves* e *Guilherme Napolitano Gonçalves*. Agradeço a Deus por ser mãe de vocês, crianças tão maravilhosas. Vocês são a razão da minha vida, minha maior riqueza, meu objetivo de vida e minha razão para acreditar no futuro. Peço desculpas pela minha ausência em alguns momentos de suas vidas, pois sofri muito por não estar presente. Amo vocês incondicionalmente.

À minha irmã *Lilian de Fátima Napolitano Pires*, aos meus padrinhos *Adelaide Napolitano Dudena* e *Valter Dudena* e à minha tia *Maria Cristina dos Reis* por acreditarem na realização dos meus sonhos.

À minha grande amiga *Luciana da Silva*, companheira de todos os momentos, por todo o apoio, dedicação e companheirismo nesta jornada. Agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho, o que me permitiu perceber que existem pessoas amigas de verdade.

A todos os *familiares* e *amigos* que sempre torceram por mim e me deram carinho!

Agradecimento especial

À minha querida orientadora *Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz*,

Como ninguém, você exerce com maestria essa função. Você professora, já foi criança e...ontem você não entendia inúmeras coisas, hoje precisa se fazer entender e criar soluções.

No seu dia-a-dia, a sua capacidade de amar é colocada à disposição de todos que de uma maneira ou de outra necessitam de sua atenção.

Quando você volta para casa, a tarefa ainda não está terminada, mas a sua consciência está em paz, pois cumpriu todos os seus deveres com toda determinação.

Você corre em paralelo com o tempo para não ficar ultrapassada. Aceita-se toda por dentro para mostrar a seriedade que é exigida e ainda sorrir para aqueles que precisam de afeto.

Na sua angústia existencial ainda se propõe a ajudar a quem procura.

Você avalia. Nossa, que coisa difícil é avaliar.

Aprova, reprova e finalmente recupera.

Pelos caminhos da sua vida, você vai encontrando tantas portas....umas quase se fecham, quando deveriam se abrir.

Tantas que se abrem, quando deveriam fechar-se, portas sombrias, enferrujadas; à espera de alguém ansioso por um toque, outras escancaradas pela falta de responsabilidade e amor.

E você, passo a passo, vai contribuindo para cada uma delas seguir o seu compasso.

Você transforma, ilumina, esclarece, compreende e vence o desafio.

É suave o mistério da sua vocação.

Como você é importante!!!

Muito obrigada por fazer parte da minha história acadêmica e me ensinar os mais preciosos valores de educação, amor à profissão e honestidade.

Agradecimentos

À *Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva*, agradeço por ter me recebido e acolhido na Odontopediatria desde o primeiro encontro, sem nem saber minha origem. Obrigado por acreditar na minha capacidade e pelo incentivo constante no aprendizado e na pesquisa.

Ao *Prof. Dr. Paulo Nelson Filho*, sempre solícito e gentil desde o primeiro momento que conheci. Parabéns pela dedicação e paciência ao transmitir seus conhecimentos e experiências, pela disposição que sempre tem para todos os seus alunos e pela simpatia e alegria que transformaram o trabalho em bons momentos. Obrigado por ter me ajudado nesta jornada.

À *Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb*, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio oferecido sempre, sem medir esforços para atender às dúvidas quando surgiam, pelas oportunidades de contribuição científica e pela fundamental colaboração para a realização deste trabalho. Professora, obrigada por ceder toda a infra-estrutura laboratorial para que eu pudesse trabalhar e realizar essa pesquisa.

Ao *Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira*, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelas oportunidades de contribuição científica, pelo apoio oferecido e pela fundamental colaboração para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor *Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros*.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora

Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e do Vice-Coordenador Prof. Dr. Paulo Nelson Filho.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Prof. Dr. Adilson Thomazinho, Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Andiará De Rossi, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Profa. Dra. Kranya Victória Diaz Serrano, Prof. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Profa. Dra. Maria Conceição Pereira Saraiva, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva e Profa. Dra. Sada Assed.*

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Prof. Dr. Alberto Consolaro e Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira.*

Aos meus amigos e colegas da Pós-Graduação *Ana Zilda Nazar Bergamo, Camila Scatena, Cintia Guimarães de Almeida, Danielle Torres Azevedo, Dinah Amoras, Elaine Machado Pinheiro, Fernanda Regina Ribeiro Santos, Jliana Ferraz Sabbatini, Késsia Suênia Fidelis de Mesquita, Luciane Almeida do Carmo, Marcela C. D. Andrucioli, Mariângela Salles Pereira Nassar, Marília Pacifico Lucisano, Marina Fernandes de Sena, Maya Fernanda Manfrin Arnez, Milena Silva Campos, Paula Dariana Fernandes Ferreira, Rodrigo Alexandre Valério e Tatiana*

do Santos Ciccone de Faria, por tornar mais fácil e agradável este processo, pelos momentos compartilhados, pela amizade e pela convivência.

À pós-graduanda *Talitha de Siqueira Mellara*, pelo apoio, dedicação e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo *Francisco Wanderley Garcia de Paula*, pelo incentivo, pela amizade e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas *Filomena Leli Placciti e Silva* e *Micheli Cristina Leite Rovanholo*, pela amizade e feliz convivência, pelo incentivo e o apoio em todos os momentos.

Aos Funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social e Clínica de Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Benedita Viana Rodrigues, Carolina Paes Torres Mantovani, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Fátima Aparecida Rizoli, Marco Antonio dos Santos, Matheus Morelli Zanela, Nilza Leticia Magalhães e Renata Aparecida Fernandes*, pela sua ajuda, paciência e amizade.

Aos Funcionários da Seção de Pós - Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo *Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilloto*, pela atenção e por estarem sempre à disposição.

Às Funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Juliana Jandiroba Faraoni Romano e Patrícia Marchi*, pela atenção e ajuda. Vocês foram maravilhosas comigo, muito obrigada.

A todos os Funcionários do Serviço de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, principalmente à *Adélia da Silva Mafud* e *Leonardo Lira do Amaral*, que me receberam com muita atenção e me ajudaram durante todo o meu trabalho. Muito obrigado.

À *Capes* (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Aos amigos *Cláudia Regina Corrêa de Matos*, *Julio César de Matos* e *Marina Corrêa de Matos* os quais colaboraram de maneira preciosa para o início de tudo e também na finalização desta etapa de minha vida.

Saber Viver

*Não sei... Se a vida é curta
Ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos
Tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas.*

Muitas vezes basta ser:

*Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.*

*É isso não é coisa de outro mundo,
É o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela
Não seja nem curta,
Nem longa demais,
Mas que seja intensa,
Verdadeira, pura... Enquanto durar.*

Cora Coralina

RESUMO

Gonçalves, LMN. **Efeito da radioterapia sobre as propriedades mecânicas, químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes - Estudo *in vitro*** Ribeirão Preto, 2012. 84 p. Dissertação [Mestrado] - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, os efeitos da radiação com cobalto-60 nas propriedades mecânicas, morfológicas e químicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes através da: 1- microdureza longitudinal; 2- microscopia eletrônica de varredura (MEV); e 3- espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX). A microdureza do esmalte e da dentina (n=12 hemisseções vestibulares) foi avaliada em três profundidades (superficial, média e profunda), antes e a cada 10 Gy de irradiação, até uma dose cumulativa de 60 Gy. A morfologia do esmalte e da dentina foi avaliada por meio de MEV (n=8 hemisseções), em 2 hemisseções vestibulares irradiadas com dose cumulativa de 30 Gy, 2 hemisseções vestibulares irradiadas com dose cumulativa de 60 Gy e 4 hemisseções palatinas não irradiadas. A composição química do esmalte e da dentina foi avaliada por meio de EDX (n=4 hemisseções), utilizando-se as mesmas hemisseções previamente submetidas à MEV (com dose cumulativa de 60 Gy de irradiação, e nas hemisseções não irradiadas). Os dados foram analisados quanto à sua distribuição e submetidos à Análise de Variância a dois critérios. Para a diferenciação das médias, empregou-se o teste de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%. Com relação à microdureza no esmalte, pôde-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A microdureza no esmalte não irradiado não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com a do esmalte após irradiação com doses de 40, 50 e 60 Gy ($p > 0,05$), e apresentou-se maior que os valores de microdureza nas doses de 10, 20 e 30 Gy ($p < 0,05$). Com relação à microdureza nas diferentes profundidades pôde-se observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas, observando-se no esmalte superficial seus maiores valores. Na análise morfológica do esmalte observou-se que os espécimes irradiados apresentaram alterações crescentes, em função do aumento da dose de radiação, em comparação ao esmalte não irradiado. A porção interprismática tornou-se mais evidente após as doses de 30 e 60 Gy. Em relação à microdureza da dentina, pôde-se observar que houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A microdureza na dentina não irradiada não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com a microdureza na dose de 40 Gy ($p > 0,05$) e apresentou valores superiores aos observados nas doses de 10, 20, 30, 50 e 60 Gy ($p < 0,05$). Em relação à microdureza nas diferentes profundidades avaliadas pôde-se observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas, sendo que a dentina média apresentou seus maiores valores. Na análise morfológica da dentina observou-se a presença de fendas na estrutura dentinária, túbulos dentinários colabados/destruídos e fragmentação das fibras colágenas nas doses de 30 e 60 Gy, sendo as alterações mais intensas com aumento da dose de irradiação, para todas as regiões analisadas, em comparação à dentina não irradiada. Na análise química do esmalte e da dentina irradiados observou-se discreto aumento de oxigênio (O) e diminuição de fósforo (P) e cálcio (Ca), em comparação aos espécimes não irradiados. Os resultados permitiram concluir que a radioterapia não influenciou a microdureza do esmalte, como um todo, entretanto, quando analisou-se nas diferentes profundidades do esmalte, verificou-se um aumento da microdureza na região superficial. Na dentina, a radioterapia ocasionou diminuição da microdureza após praticamente todas as doses de radiação, em comparação à dentina não irradiada, sendo que na região da dentina média observaram-se seus menores dos valores. As alterações morfológicas das estruturas do esmalte e da dentina foram crescentes com o aumento das doses de irradiação observando-se a porção interprismática mais evidente, presença de fendas e túbulos dentinários colabados/destruídos e fragmentação progressiva das fibras colágenas. Quimicamente, após a irradiação, tanto no esmalte como na dentina, observou-se um discreto aumento na porcentagem de oxigênio e redução nas porcentagens de fósforo e cálcio.

Palavras- chave: 1. Radioterapia 2. Cobalto-60 3. Dentes permanentes 4. Microdureza 5. Microscopia eletrônica de varredura 6. Espectroscopia de energia dispersiva de raios X

ABSTRACT

Gonçalves, LMN. **Effect of radiotherapy on the mechanical, chemical and morphological property of the enamel and of the dentine of permanent teeth - In vitro study** Ribeirão Preto, 2012. 84 p. Dissertação [Mestrado] - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The present study had as objective to evaluate, in vitro, the effect of the radiation of 60 Cobalt (Co 60) in the mechanical, morphological and chemical properties of the enamel and of the dentine of permanent teeth by means of: 1- longitudinal microhardness; 2- scanning electron microscopy (SEM); and 3; energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). The microhardness of the enamel and of the dentine (n = 12 vestibular hemisections) was evaluated in three depths (superficial, medium and deep), before and at each 10 Gy of irradiation, until a total cumulative dose of 60 Gy. The morphology of the enamel and of the dentine was evaluated by means of a SEM (n = 8 hemisections), in 2 irradiated vestibular hemisections with total cumulative dose of 30 Gy, 2 irradiated vestibular hemisections with total cumulative dose of 60 Gy and 4 not irradiated palatine hemisections (control). The chemical composition of the enamel and of the dentine was evaluated by means of EDX (n = 4 hemisections), using the same hemisections previously submitted to SEM (with cumulative dose of 60 Gy of irradiation, and in the not irradiated hemisections). The data were analyzed about their distribution and submitted to the Analysis of Variance at two criteria. For the differentiation of the averages, the test of Fisher was used. The level of significance adopted was of 5%. About the longitudinal microhardness in the enamel, it was possible to be observed that there was no statistically significant difference between the groups ($p < 0,05$). The microhardness in the not irradiated enamel was similar to the enamel after the irradiation with doses of 40, 50 and 60 Gy ($p > 0,05$) and higher than the microhardness values in the doses of 10, 20, e 30 Gy ($p < 0,05$). About the microhardness in the different depths it was observed significant difference ($p < 0,05$) between them, being observed in the superficial enamel the greatest values of microhardness. In the morphological analysis of the enamel it was observed that the irradiated specimens presented growing alterations, due to the increase of the radiation dose, comparing to the not irradiated enamel. There was no difficulty in observing the prisms and the crystals after the irradiation, however the interprismatic portion became more evident after the radiation doses of 30 and 60 Gy. About the longitudinal microhardness of the dentine, it could be observed that there was significant difference between the groups ($p < 0,05$). The microhardness of the not irradiated dentine was not statistically significant compared to the microhardness in the dose of 40 Gy ($p > 0,05$) and it presented higher values to the observed ones in the doses of 10, 20, 30, 50 and 60 Gy ($p < 0,05$). About the relation to the microhardness in the different evaluated depths it was possible to observe significant difference ($p < 0,05$) among them, being that the medium dentine presented the highest values of microhardness. In the morphological analysis of the dentine it was observed the presence of cracks in the dentine structure, collapsed/destroyed dentine tubules and fragmentation of the collagen fibers in the doses of 30 and 60 Gy, being the alterations more intense with the increase of the dose of irradiation, for all the analyzed regions, comparing to the not irradiated dentine. In the chemical analysis of the irradiated enamel and the dentine it was observed the slight increase of oxygen (O) and decrease of phosphorus (P) and Calcium (Ca), comparing to the not irradiated specimens. The result allowed to be concluded that the radiotherapy occasioned the decrease of the microhardness of the enamel after the doses from 10 to 30 Gy, but in the following doses there was an increase of the microhardness, which became similar to the not irradiated enamel, being that in the superficial region it was observed the biggest increase of the microhardness. In the dentin, the radiotherapy caused decrease of the microhardness after practically all doses of radiation, comparing to the not irradiated dentine, being that in the region of the medium dentine the lowest values of microhardness were observed. The morphological alterations of the enamel and of the dentine structure were growing with the increase of the radiation doses observing the more evident interprismatic portion, presence of cracks and collapsed/destroyed dentine tubules and progressive fragmentation of collagen fibers. Chemically, after the irradiation, not only in the enamel but also in the dentin, it was observed a slight increase of percentage of the oxygen and decrease in the percentages of phosphorus and calcium.

Key words: 1. Radiotherapy 2. 60 Cobalt 3. Permanent teeth 4. Microhardness 5. Scanning electron microscopy 6. Energy-dispersive X-ray spectroscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. PROPOSIÇÃO.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Aspectos éticos.....	29
3.2 Seleção dos dentes.....	29
3.3 Preparo dos dentes.....	30
3.4 Delineamento experimental.....	32
3.5 Irradiação com Co-60.....	32
3.6 Microdureza longitudinal	33
3.6.1 Microdureza longitudinal pré-irradiação com Co-60.....	33
3.6.2 Microdureza longitudinal pós-irradiação com Co-60.....	34
3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
3.8 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX).....	38
3.9 Análise dos dados.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Microdureza longitudinal.....	43
4.1.1 Esmalte.....	43
4.1.2 Dentina.....	45
4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	48
4.2.1 Esmalte.....	48
4.2.2 Dentina.....	52
4.3 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX).....	57
5. DISCUSSÃO.....	58
5.1 Metodologia.....	59

5.2 Esmalte.....	61
5.3 Dentina.....	66
6. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXO.....	83

Introdução

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), o qual é um órgão do Ministério da Saúde do Brasil voltado a ações nacionais integradas para o controle e prevenção da neoplasia, “câncer” é um termo utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os órgãos e tecidos, com possibilidade de ocasionar metástase para outras regiões do corpo.

Os agentes causais do câncer são variados, podendo ser externos ou internos ao organismo, estando ambos inter-relacionados. Os agentes externos relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um indivíduo e/ou ambiente social e cultural. Os internos são, na maioria das vezes, geneticamente predeterminados, estando ligados à capacidade do organismo se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. De todos os casos de câncer, 80 a 90% estão associados a fatores ambientais (INCA, 2011).

Em 2008 foi efetuada uma estimativa sobre a incidência e mortalidade de 27 tipos de câncer, em 182 países, como parte da série GLOBOCAN, publicada pela *Agency for Research on Cancer* (IARC, 2012). Com base nessa estimativa, a qual constitui-se, ainda hoje, a mais recentemente disponibilizada pela IARC, Ferlay et al. (2010) apresentaram os resultados dos padrões globais para os 8 tipos de câncer mais comuns, em 20 regiões do mundo. No geral, aproximadamente 12,7 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de mortes por câncer ocorreram em 2008. Um total de 56% de novos casos e de 63% das mortes por câncer ocorreram em regiões menos desenvolvidas. No Brasil, estimativas do INCA para o ano de 2012 apontam para a ocorrência de 520.000 novos casos de câncer (INCA, 2012). Com relação especificamente ao câncer de cabeça e pescoço, no mundo são diagnosticados por ano aproximadamente 500.000 novos casos (Shibuya et al., 2002).

A incidência do câncer na região de cabeça e pescoço sofre aumento com a idade, sendo o carcinoma de células escamosas, o tipo histológico mais freqüente,

presente em mais de 90% dos casos (Casiglia e Woo, 2001), com ocorrência aproximada de 40% na cavidade bucal, 25% na laringe e 15% na faringe. O restante dos casos localiza-se nos demais sítios remanescentes, como por exemplo, as glândulas salivares. Outros tumores da região da cabeça e pescoço, tais como cérebro, tireóide e face não são convencionalmente inclusos no termo “câncer de cabeça e pescoço” (Döbrossy, 2005).

O câncer de cabeça e pescoço é caracterizado pela agressividade local e pelo risco de ocorrência de tumores secundários, o qual está estimado em 20% (Kim et al., 2002), sendo geralmente maior em mulheres do que em homens (Braakhuis et al., 2005). Evidências epidemiológicas sugerem que diferentes fatores podem estar associados com o aumento da probabilidade de ocorrência destes cânceres, verificando-se uma relação consistente entre o câncer de boca e laringe e o fumo (Döbrossy, 2005).

Indivíduos diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço podem ser tratados cirurgicamente, por meio de radioterapia, por meio de quimioterapia ou ainda pela combinação destas duas formas de tratamento (Hong et al., 2001; Lyons, 2006; Lazarus et al., 2007; INCA 2012). A radioterapia é uma modalidade de tratamento que utiliza a radiação ionizante como agente terapêutico (Novaes, 1998; Chaachouay et al., 2011), a mesma é amplamente usada para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço, como terapia primária adjuvante ao tratamento cirúrgico, em conjunção simultaneamente com a quimioterapia ou como tratamento paliativo em tumores de cabeça e pescoço em estágios finais e inoperáveis (Adelstein, 2003; Soares et al., 2011).

As manifestações ou complicações mais freqüentes da radioterapia na região de cabeça e pescoço são xerostomia, mucosites, candidíase, disgeusia, perda do paladar, trismo muscular, alterações vasculares, osteorradionecrose e cárie de radiação (Pistóia et al., 2004). A incidência e a prevalência precisa das sequelas e dos efeitos colaterais induzidos pela radioterapia são difíceis de serem obtidos, com valores variando de 13 a 89% (Ohrn et al., 2001).

A cárie de radiação é uma doença complexa e destrutiva, de origem multifatorial, que atinge pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço, prejudicando a qualidade de vida desses pacientes (Silva et al., 2009a) sendo, de acordo com Al-Nawas et al. (2000), a principal complicação em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia. Evidências científicas

sugerem que em pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço o risco para o desenvolvimento da cárie de radiação estará presente por toda a vida, e não apenas durante ou logo após o tratamento (Kielbassa et al., 2006). Os principais agentes causais da cárie de radiação incluem alterações na qualidade e na quantidade da saliva, dificuldade em realizar uma higiene bucal adequada, aumento do consumo de alimentos cariogênicos e alterações na microbiota bucal (Jansma et al., 1990; Kielbassa, 2000; Kielbassa et al., 2000; Vissink et al., 2003; Kielbassa et al., 2006; Silva et al., 2009a e b). A microbiota bucal de pacientes com câncer de cabeça e pescoço é evidentemente alterada durante o tratamento radioterápico, sendo a Candida albicans o microorganismo predominantemente associado a infecções sintomáticas (Stokman et al., 2003).

Visando elucidar outros fatores que poderiam predispor pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço à maior susceptibilidade ao desenvolvimento da cárie de radiação, estudos foram realizados a fim de pesquisar os efeitos diretos da irradiação na estrutura dental, com resultados controversos.

Assim, Jansma et al. (1990), Kielbassa et al. (1999; 2000), Kielbassa (2000) e Silva et al. (2009a) verificaram que a irradiação não é capaz de ocasionar alterações nas estruturas de dentes permanentes.

Em 1990, Jansma et al. avaliaram o efeito da irradiação terapêutica (dose de 2Gy, duas vezes ao dia, até o total de 72 Gy) na permeabilidade do esmalte dental bovino, por meio de difusão de radioisótopo. Embora alterações na permeabilidade do esmalte dos dentes irradiados não tenham sido observadas, os autores sugeriram a ocorrência de alterações químicas.

Kielbassa et al. (1999) avaliaram a correlação entre os resultados da microdureza e microrradiografias transversais de lesões de cárie induzidas, *in situ*, em espécimes de esmalte humano irradiado com doses de 60 Gy e não irradiado. Os espécimes foram acoplados em dispositivos mandibulares, que continham do mesmo lado um espécime irradiado e um não irradiado, os quais foram utilizados por pacientes, durante 6 semanas. Apenas um dos lados do dispositivo foi escovado, diariamente, com dentífrício não fluoretado. A perda mineral foi calculada com auxílio de um software nos mesmos locais onde foi avaliada a microdureza. Os autores verificaram que a microdureza e as microrradiografias transversais não demonstraram diferença significativa com relação às lesões de cárie nos espécimes irradiados e não irradiados, e concluíram que o esmalte irradiado não é mais

susceptível à cárie que o não irradiado, se padrões adequados de higiene bucal forem adotados.

Por meio de estudos microscópicos e microrradiográficos, em 2000 Kielbassa et al. avaliaram, *in situ*, o início da desmineralização do esmalte dental humano irradiado com doses de 60 Gy e não irradiado. Os espécimes foram acoplados em dispositivos mandibulares, que continham do mesmo lado um espécime irradiado e um não irradiado, os quais foram utilizados por pacientes, durante 6 semanas. Apenas um dos lados do dispositivo foi escovado, diariamente, sendo o dentífrício não fluoretado. Os resultados demonstraram ausência de diferenças microscópicas e microrradiográficas entre as lesões de cárie no esmalte dos espécimes irradiados e não irradiados. Os autores concluíram que os efeitos diretos da irradiação no esmalte dental não são os responsáveis pelo início da desmineralização sob condições clínicas, e que o início das lesões de cárie em esmalte irradiado pode ser controlado por técnicas de higiene bucal.

Em 2000, Kielbassa avaliou *in situ*, por meio de estudos microscópicos e microrradiográficos, a desmineralização inicial da dentina humana irradiada com doses de 60 Gy e não irradiada. Os espécimes foram acoplados em dispositivos mandibulares, que continham do mesmo lado um espécime irradiado e um não irradiado, os quais foram utilizados por pacientes, durante 5 semanas. Apenas um dos lados do dispositivo foi escovado, diariamente, com dentífrício não fluoretado. Os resultados demonstraram ausência de diferenças significantes com relação à perda mineral e profundidade da lesão de cárie entre os espécimes irradiados e não irradiados, sendo essa diferença observada apenas entre os espécimes escovados e os não escovados. Portanto, a dentina de dentes irradiados não se tornou mais susceptível à cárie, em comparação a dos dentes não irradiados, quando submetida à higiene bucal adequada.

Silva et al. (2009a) avaliaram os padrões de desmineralização das lesões de cárie nos pacientes irradiados e verificaram que a lesão de cárie cervical e incisal foram largamente detectadas. Adicionalmente, descoloração marrom difusa da superfície do esmalte foi frequentemente observada e a microscopia de luz polarizada sugeriu que essas áreas eram relativas a lesões de cárie incipientes. Foi observada, ainda, evidência de função odontoblástica normal em detrimento da presença de dentina reacional e deposição de dentina intratubular. Os autores concluíram que a lesão de cárie relacionada à irradiação apresenta a mesma

morfologia e padrão que as não relacionadas à irradiação, com presença de dentina mineralizada, zona translúcida, dentina com tratos mortos, dentina reacional e deposição de dentina intratubular.

Por outro lado, estudos em dentes permanentes e em dentes bovinos, demonstraram que a irradiação ocasiona efeitos diretos sobre a estrutura dental, sendo estes efeitos parte da patogênese da cárie de radiação (Jervoe, 1970; Markitziu et al., 1986; Jansma et al., 1988; Pioch et al., 1992; Kielbassa et al., 1997; Grötz et al., 1997; 1998; Al-Nawas et al., 2000; Springer et al., 2005; Açil et al., 2007; Soares et al., 2010; 2011).

No ano de 1970, Jervoe demonstrou, por meio de difração de raios-X, que a irradiação de dentes humanos com 1 Mega-rad (M-rad), tanto em doses simples como em doses cumulativas, assim como a irradiação *in situ* com 12000rad, induziu alterações na estrutura cristalina do esmalte e da dentina.

Em 1986, Markitziu et al. avaliaram, *in vitro*, os efeitos da irradiação na solubilidade e dureza do esmalte e da dentina de dentes humanos pré-tratados ou não com flúor. A exposição à irradiação não afetou a solubilidade do esmalte dos dentes não tratados ou pré-tratados com flúor. Entretanto, no grupo submetido à irradiação a solubilidade da dentina dos dentes não tratados com flúor diminuiu. Com relação à microdureza, não foram observadas alterações nos espécimes de esmalte irradiados, com ou sem pré-tratamento com flúor. No entanto, a exposição à irradiação diminuiu a dureza da dentina quando não ocorreu o pré-tratamento com flúor.

Jansma et al. (1988) avaliaram o efeito da irradiação na desmineralização do esmalte dental bovino, *in vitro*. Os autores observaram que as medidas de microdureza após a desmineralização mostraram diferenças significantes entre o esmalte irradiado e não irradiado. Microrradiografias quantitativas mostraram que tanto a perda mineral quanto a profundidade da lesão foram significativamente menores para os espécimes irradiados que para os não irradiados, demonstrando que a irradiação diminuiu a solubilidade ácida do esmalte.

Pioch et al., (1992) observaram, *in vitro*, redução significativa na estabilidade da região da junção amelodentinária de incisivos bovinos, após irradiação com Cobalto-60 (dose total de 70 Gy), por meio de testes de resistência ao cisalhamento e de observação por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que a irradiação causou mudanças nas propriedades biofísicas dos

dentes e que a redução na estabilidade da junção amelodentinária é compatível com as características clínicas frequentemente observadas em pacientes após a irradiação, que incluem a perda de esmalte resultando na exposição da dentina na região cervical ou vestibular de incisivos, assim como da superfície oclusal de molares.

Estudos *in vitro*, realizados por Kielbassa et al. (1997), tiveram como objetivo avaliar os efeitos da irradiação, com doses de 60 Gy, na microdureza da dentina de dentes bovinos, em presença ou ausência de flúor. Os autores concluíram que a dentina foi severamente afetada pela irradiação e que a fluoretação com géis ácidos diminuiu a microdureza da superfície dentinária e não preveniu seu amolecimento devido à irradiação. Segundo os autores, esta pode ser a explicação para a formação de “gaps” na junção amelodentinária, perda de esmalte dental e lesões de cárie cervicais que acometem indivíduos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço.

Grötz et al. (1997) sugeriram que as alterações na junção amelodentinária de dentes submetidos à irradiação ocorreriam em função da atrofia dos processos odontoblásticos. A obliteração dos túbulos dentinários, precedida pela degeneração dos processos odontoblásticos, seria resultado do dano celular causado pela irradiação, a qual ocasionaria impedimento da vascularização e do metabolismo, particularmente, na área das terminações dos processos odontoblásticos.

Em 1998, Grötz et al. estudaram os efeitos diretos da radioterapia sobre o esmalte dental. Espécimes de esmalte submetidos a altas doses de radiação *in vitro* (500-2500 Gy), espécimes de esmalte submetidos à irradiação *in situ* (60 Gy) e dentes extraídos de pacientes devido a complicações pós-tratamento radioterápico (36 ou 60 Gy) permitiram verificar que a desmineralização em áreas subsuperficiais de dentes de pacientes submetidos à radioterapia é caracterizada pela perda total da estrutura prismática. Os autores concluíram que ocorrem diferenças micromorfológicas significantes no processo de desmineralização do esmalte de dentes submetidos à irradiação, o qual se torna menos resistente ao ataque ácido.

Em 2005, Springer et al. verificaram, por meio da mensuração das proteínas hidroxilisipiridinolina e lisipiridinolina, as quais são duas reações protéicas cruzadas não reduzidas no colágeno maduro, que aumentam quando ocorre a destruição do colágeno por radiação, que a irradiação na dose de 6.3 Gy/dia, por 5 dias, causou danos diretos sobre o colágeno do tecido pulpar. Entretanto os autores não

verificaram alterações mensuráveis do componente colágeno nos tecidos dentais mineralizados, creditando esse fato à concentração relativamente baixa destas proteínas no esmalte e na dentina.

Açil et al. (2007) avaliaram, *in vitro*, o dano direto e imediato ao colágeno, como consequência direta da irradiação com dose de 60 Gy, em tecido ósseo, periósteo e pele de mandíbulas de porcos, em comparação às mandíbulas não irradiadas. Os tipos de colágeno foram caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a maturação das fibras, determinada pela quantidade de ligações cruzadas hidroxilisilpiridinolina (HP) e lisilpiridinolina (LP), foi avaliada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A mensuração da quantidade de hidroxiprolina (Hyp) foi utilizada para determinar a razão entre a quantidade de fragmentos de colágeno nas amostras irradiadas comparado às amostras não irradiadas. A concentração de HP, LP e Hyp no grupo irradiado encontrou-se marcadamente aumentada. SDS-PAGE demonstrou a presença de colágeno I e IV no osso não irradiado, I e III na pele não irradiada, e I no periósteo não irradiado. Nas amostras irradiadas, bandas difusas demonstraram a fragmentação da molécula de colágeno. O aumento da concentração de HP, LP e Hyp indicaram o aumento da concentração de colágeno desnaturado, demonstrando o dano direto e imediato da irradiação sobre o colágeno.

Em 2010, Soares et al. avaliaram o efeito da irradiação gama sobre a resistência à tração do esmalte e da dentina de dentes permanentes, em relação à orientação dos prismas, dos túbulos dentinários e da sua localização. Quarenta terceiros molares humanos permanentes foram usados, sendo metade deles submetidos a 60 Gy de irradiação gama, com dose de 2 Gy/dia, e avaliados por meio do teste de microtração. Os resultados demonstraram que o tratamento com irradiação diminuiu significativamente a resistência à tração da dentina coronária e radicular e do esmalte, a despeito da orientação dos túbulos e dos prismas. Com ou sem irradiação o esmalte foi significativamente mais forte quando testado paralelamente à sua orientação prismática. A dentina coronária e radicular, não irradiada, apresentou resistência à tração significativamente maior quando testada perpendicularmente à orientação dos túbulos. Entretanto, quando os dentes foram irradiados, não houve influência da orientação dos túbulos, demonstrando que a irradiação é mais danosa aos componentes orgânicos que aos inorgânicos.

Soares et al. (2011) realizaram um estudo *in vitro*, com o objetivo de avaliar se diferentes protocolos de uso de enxaguatórios bucais eram capazes de prevenir os danos decorrentes da irradiação gama, com relação à resistência à tração do esmalte e da dentina. Cento e vinte dentes foram divididos em dois grupos: irradiados (submetidos a 60 Gy de irradiação gama, em incrementos diários de 2 Gy) e não irradiados. Estes foram subdivididos em dois protocolos, utilizando soluções para bochechos, três vezes ao dia, de clorexidina a 0,12% ou de fluoreto de sódio a 0,05%, e um grupo controle. Os espécimes foram avaliados por teste de microtração. Os resultados indicaram que a irradiação gama reduziu significativamente a resistência à tração do esmalte e da dentina coronária e radicular. Alterações macromoleculares foram sugeridas na dentina enquanto que alterações estruturais foram detectadas em ambos substratos por microscopia eletrônica de varredura. Bochechos com clorexidina a 0,12% preveniram parcialmente os danos às propriedades mecânicas da dentina coronária irradiada, enquanto que o fluoreto de sódio a 0,05% apresentou similaridade no teste de resistência à tração, tanto no esmalte irradiado quanto não irradiado.

Apesar dos vários estudos descritos acima, o exato mecanismo do desenvolvimento da cárie dental pós-radioterapia na região de cabeça e pescoço continua controverso (Grötz et al., 1998; Al-Nawas et al., 2000; Craddock, 2006; 2008), sendo atribuído ora aos efeitos indiretos da radiação (Jansma et al., 1990; Kielbassa et al., 2000; Kielbassa, 2000; Silva et al., 2009a) que levam a alterações salivares, dificuldades de higiene bucal, maior consumo de alimentos cariogênicos e alterações da microbiota bucal; e ora aos efeitos diretos da radiação (Jervoe, 1970; Markitziu et al., 1986; Jansma et al., 1988; Pioch et al., 1992; Kielbassa et al., 1997; Grötz et al., 1997; 1998; Al-Nawas et al., 2000; Springer et al., 2005; Açil et al., 2007; Soares et al., 2010; 2011) que ocasionam alterações morfológicas, físicas e químicas no esmalte e na dentina.

Tendo em vista o fato dos estudos publicados a respeito dos efeitos diretos da radioterapia na estrutura dental serem escassos e controversos, verificamos a necessidade de estudos adicionais, com diferentes metodologias, a fim de elucidar o efeito da radioterapia sobre os diferentes substratos dentais.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, os efeitos da irradiação com cobalto-60 (Co-60), nas propriedades mecânicas, morfológicas e químicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes por meio da:

- Microdureza longitudinal;
- Microscopia eletrônica de varredura (MEV); e
- Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Inicialmente, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo número 2011.1.365.58.3), tendo sido aprovado (Anexo A).

3.2 SELEÇÃO DOS DENTES

A amostra foi constituída de 16 molares permanentes hígidos, de humanos, superiores e inferiores, recém extraídos, obtidos junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, armazenados em água destilada, à temperatura de 4 °C.

Os dentes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água, com o auxílio de uma escova tipo Robinson montada em micromotor, em baixa rotação. A seguir, com o auxílio de uma sonda exploradora e de um estereomicroscópio (Nikon Inc. Instrument Group, Melville, New York, United States of America) com aumento de 10x, foi realizado o exame tátil e visual, sendo selecionados apenas os dentes que não apresentaram trincas, fraturas, lesões de cárie ou anomalias de estrutura.

Após serem selecionados, os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% supersaturada, durante 1 semana. A seguir, foram lavados em água por 24 horas, colocados em recipientes contendo água destilada e congelados a -20 °C, até o início dos experimentos.

3.3 PREPARO DOS DENTES

Os dentes previamente selecionados foram inicialmente seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária, com disco diamantado adaptado em máquina de corte (Miniton, Struers A/S, Copenhagen, Dinamarca), sob refrigeração, para remoção das raízes.

Cada dente foi então seccionado no sentido méso/distal, obtendo-se duas metades, sendo uma correspondente à hemisseccção vestibular e outra à hemisseccção lingual ou palatina, num total de 32 hemisseccções. As superfícies seccionadas foram lixadas com lixas d'água (Norton S/A, Curitiba, Brasil) de granulação # 600 e # 1200 e polidas com feltro embebido em alumina (Arotec S/A, Cotia, Brasil) de 0,3 μm e 0,05 μm . Todo o procedimento de polimento superficial foi realizado em politriz (DP-9U2, Panambra/Struers, A/S, Copenhagen, Denmark), sob refrigeração (Fluxograma 1).

Fluxograma 1. Metodologia empregada na seleção e preparo dos dentes.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As 32 hemisseções dentais, vestibulares e linguais/palatinas correspondentes, foram submetidas a três experimentos. Para tal finalidade foram subdivididas randomicamente em três grupos, pelo método de sorteio aleatório.

No primeiro experimento foi avaliada a microdureza do esmalte e da dentina (n=12 hemisseções vestibulares), antes e a cada 10 Gy de irradiação com Co-60, até uma dose cumulativa total de 60 Gy.

No segundo experimento foi avaliada a morfologia do esmalte e da dentina por meio de microscopia eletrônica de varredura (n=8 hemisseções), sendo 2 hemisseções vestibulares irradiadas com Co-60 com a dose cumulativa de 30 Gy, 2 hemisseções vestibulares irradiadas com a dose cumulativa de 60 Gy e 4 hemisseções palatinas não irradiadas.

No terceiro experimento, identificou-se os elementos químicos do esmalte e da dentina por meio de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) (n=4 hemisseções), utilizando-se as mesmas hemisseções previamente submetidas à microscopia eletrônica de varredura na dose cumulativa de 60 Gy de irradiação com Co-60 e nas hemisseções não irradiadas. No primeiro experimento a microdureza, antes e após a irradiação, foi avaliada na mesma hemisseção dental (face vestibular). Já no segundo e terceiro experimentos, as hemisseções vestibulares foram submetidas à irradiação e as hemisseções palatinas do mesmo dente não foram irradiadas, funcionando como controle.

3.5 IRRADIAÇÃO COM Co-60

Para esse procedimento as hemisseções dentais (face vestibular) a serem irradiadas foram colocadas em placas de acrílico para cultura de células de 24 poços (Cellstar®, ref. 657160, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany), possibilitando que todas recebessem a mesma irradiação direta por unidade de área. Com o intuito de manter as hemisseções dentais em um ambiente úmido,

simulando as características da cavidade bucal, durante a irradiação cada poço foi preenchido com 10 ml de saliva artificial, com pH = 7,0 (Farmácia Ensino da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil), recobrindo totalmente as hemisseccções.

A seguir as hemisseccções dentais foram expostas à irradiação com Co-60 em aparelho de telecobaltoterapia (Siemens modelo Gammatron 580, Munich, Germany), no Serviço de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, com distância da fonte de 80 cm, com dose de 1 Gy/min. As hemisseccções dentais foram irradiadas com fração de dose de 2 Gy, por 5 dias consecutivos, até atingirem a dose total de 60 Gy, com um total de 30 ciclos, durante 6 semanas (Kielbassa et al., 2000; Açil et al., 2007; Aggarwal, 2009; Bulucu et al., 2009; Soares et al., 2010; 2011).

Entre os ciclos de irradiação as hemisseccções foram mantidas em saliva artificial renovada diariamente, em estufa a 37 °C (Olidef CZ, Indústria e Comércio de Aparelhos Hospitalares Ltda., Ribeirão Preto, Brasil).

3.6 MICRODUREZA LONGITUDINAL

3.6.1 MICRODUREZA LONGITUDINAL PRÉ-IRRADIAÇÃO COM Co-60

Inicialmente, a microdureza longitudinal inicial do esmalte e da dentina de dentes permanentes foi avaliada nas hemisseccções vestibulares de 12 dentes, antes destas serem submetidas à irradiação. Para a análise da microdureza, as hemisseccções foram adaptadas a uma base de acrílico (lâmina de plexiglass) com auxílio de um paralelômetro (ElQuip, São Carlos, Brasil) e niveladas de forma a deixar a região mais planificada da hemisseccção paralela à base. Em seguida, as hemisseccções foram fixadas e estabilizadas com cera para escultura (Kota Ind. e Com. Ltda, São Paulo, Brasil), aquecida com gotejador elétrico (Guelfi Equipamentos, Ribeirão Preto, Brasil).

A microdureza longitudinal foi avaliada em um microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000- Corporation, Kyoto, Japan), com auxílio de um penetrador de diamante para dureza Knoop (KH), aplicando uma carga de 25 gf com duração de 10 segundos no esmalte e uma carga de 10 gf com duração de 15 segundos na dentina, de maneira que a ponta do penetrador permanecesse paralela à superfície do esmalte e da dentina.

No esmalte, foram realizadas indentações em três regiões distintas: a primeira a 50 µm da borda externa (esmalte superficial), a segunda na metade da espessura do esmalte (esmalte médio) e a terceira a 50 µm da junção amelodentinária (esmalte profundo).

Similarmente ao esmalte, na dentina foram selecionadas três regiões para a realização das indentações, sendo a primeira região a 50 µm da junção amelodentinária (dentina superficial), a segunda na metade da espessura da dentina (dentina média) e a terceira a 50 µm da câmara pulpar (dentina profunda).

Para cada região selecionada foram realizadas três medidas de microdureza, sendo a distância entre elas de 100 µm no esmalte e de 150 µm na dentina. A média dessas medidas foi utilizada para a análise dos dados.

Uma vez avaliada a microdureza inicial das 12 hemisseções vestibulares dos dentes, estes foram submetidos à irradiação com Co-60.

3.6.2 MICRODUREZA LONGITUDINAL PÓS-IRRADIAÇÃO COM Co-60

As medidas de microdureza após a irradiação com Co-60, ou seja, microdureza longitudinal final do esmalte e da dentina, foram realizadas nas mesmas 12 hemisseções dentais vestibulares, a cada 5 ciclos de irradiação, que equivale a uma dose de 10 Gy e a um período de tempo de 5 dias consecutivos. A última medida de microdureza foi realizada após totalizar 30 ciclos de irradiação, que equivale a uma dose de 60 Gy, e a um período de tempo de 30 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Número de ciclos de irradiação, períodos de tempo e doses totais empregadas, nas 12 hemissecções dentais avaliadas, com relação à microdureza longitudinal

Número de ciclos de irradiação	Períodos de tempo (dias)	Doses totais (2 Gy por ciclo)
5	5	10 Gy
10	10	20 Gy
15	15	30 Gy
20	20	40 Gy
25	25	50 Gy
30	30	60 Gy

As medidas de microdureza longitudinal do esmalte e da dentina, após a irradiação com Co-60, foram realizadas da mesma forma anteriormente descrita para a realização da microdureza pré-irradiação (Fluxograma 2).

Fluxograma 2 . Metodologia empregada para análise da microdureza longitudinal pré e pós os ciclos de irradiação com Cobalto 60.

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para este experimento foram utilizadas 8 hemisseções dentais, que correspondiam a 2 hemisseções irradiadas com uma dose cumulativa de 30 Gy, 2 irradiadas com uma dose cumulativa de 60 Gy e suas respectivas hemisseções não irradiadas.

Inicialmente, as hemisseções dentais foram submetidas ao seguinte protocolo: fixação (imersão em solução de glutaraldeído a 2,5% tamponado com solução de cacodilato de sódio a 0,1 M com pH 7,4) à temperatura de 4 °C por 12 horas; lavagem em água destilada por 3 minutos, limpeza em cuba ultrassônica (UltrasonicCleaner T-1449-D. Odontobrás Ind. e Com., Ribeirão Preto, Brasil) contendo água destilada e deionizada durante (2 ciclos de 5 minutos), aplicação de ácido fosfórico a 37% (Gel Etchant- Kerr Corporation, Orange, USA) no esmalte por 30 segundos e aplicação de EDTA na dentina por 30 segundos, lavagem com água destilada, secagem e desidratação em graus crescentes de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, Brasil): 25% (20 min), 50% (20 min), 75% (20 min), 95% (30 min) e 100% (60 min). Após a desidratação, as hemisseções foram imersas em solução de HMDS (Hexamethyldisiloxane-Merck KgaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos para secagem química. Todos esses procedimentos foram realizados no interior de uma capela com o exaustor acionado.

Após a secagem, as hemisseções dentais foram fixadas em *stubs* com fita adesiva de carbono, de dupla face (ElectronMicroscopySciences, Washigton, EUA) e a cobertura com ouro foi realizada em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, Foehrenwg 16, Balzers, Alemanha), com pressão de 0,01 mbar, corrente de 40 mA, distância de trabalho de 50 mm, tempo de cobertura de 90 segundos e espessura média de deposição de 20 a 30 nm. Em seguida, as seções dentais foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (Philips XL30 FEG, Eindhoven, Holanda); disponibilizado pelo (DEMa - Laboratório do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil) para verificação de possíveis alterações causadas nos substratos dentais (esmalte e dentina), obtendo-se eletromicrografias das áreas representativas com aumentos de 5000x, 10000x e 20000x. As áreas analisadas corresponderam a

toda a espessura do esmalte e da dentina (comparação morfológica e qualitativa) (Fluxograma 3).

3.8 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDX)

Quatro hemissecções dentais (2 hemissecções irradiadas com dose cumulativa total de 60 Gy e suas respectivas hemissecções não irradiadas) foram submetidas à análise química por fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDX) no aparelho Philips XL30 FEG, (Eindhoven, Holanda), equipado com uma microsonda EDS de Raios X, disponibilizado pelo DEMa (Laboratório do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil). A superfície da amostra foi analisada longitudinalmente por dispersão de energia da radiação proveniente de um tubo de Rh, posicionado a 90° e acoplado a um sistema computadorizado. A amostra foi irradiada com feixe de raios X de raio de 50 µm.

A voltagem do tubo foi de 50 kV, com um ajuste automático da corrente e um feixe de diâmetro de 50 µm. As medidas foram realizadas com um tempo de 100 segundos por ponto. Para cada amostra, o mapeamento dos componentes oxigênio (O), fósforo (P) e cálcio (Ca) foi realizado em linha de 40 x 1 pontos, com passos de 10 µm, utilizando-se 50 kV, em tempo real de aquisição (1 segundo por ponto), com um tempo final de escaneamento de 36 minutos por amostra.

Em todas as medidas a contagem da radiação foi feita por um detector semicondutor de Si (Li) refrigerado por nitrogênio líquido. O reagente de hidroxiapatita estequiométrica sintética (Sigma-Aldrich; Sintra, Portugal), grau de pureza 99.99% $[\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3]$, foi utilizado como referência de calibração. As condições analíticas foram baseadas no método dos parâmetros fundamentais. As variáveis para o cálculo da fórmula química foram estabelecidas para os pesos relativos de O, Ca e P e foi utilizado como balanço químico. O hidrogênio (H) não foi considerado no balanço total de massa, uma vez que a sua massa é equivalente a apenas 0,1% do peso total da hidroxiapatita.

Após a realização do mapeamento, os espectros correspondentes a cada amostra foram tratados, utilizando o software do sistema do EDX (PCMEDX V. 1.04, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Para análise descritiva dos dados, utilizou-se a concentração em peso dos elementos Ca, P e O (Fluxograma 3).

Fluxograma 3. Metodologia empregada para análise por microscopia eletrônica de varredura e por espectroscopia de energia dispersiva de raios X.

3.9 ANÁLISE DOS DADOS

Para a microdureza os dados foram analisados quanto à sua distribuição, a qual apresentou uma distribuição normal e homogênea, sendo a seguir submetidos à Análise de Variância a dois critérios. Para a diferenciação das médias, empregou-se o teste de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados obtidos em MEV e EDX não foram analisados estatisticamente uma vez que o objetivo da análise foi fazer uma comparação qualitativamente das diferentes condições experimentais propostas no estudo.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 MICRODUREZA LONGITUDINAL

4.1.1 ESMALTE

Na análise dos dados pôde-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A microdureza no esmalte não irradiado (controle) não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação à microdureza do esmalte após as doses 40, 50 e 60 Gy de irradiação ($p > 0,05$), e apresentou-se maior que os valores de dureza nas doses de 10, 20 e 30 Gy ($p < 0,05$) (Figura 1 e Tabela 2).

Figura 1. Valores médios da microdureza longitudinal (Knoop) no esmalte não irradiado e após as diferentes doses de irradiação.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão da microdureza longitudinal (Knoop) no esmalte não irradiado e após as diferentes doses de irradiação

GRUPO	MÉDIA ± DP
Controle	202,43±44,12 a
10 Gy	177,94±36,01 b
20 Gy	165,10±33,41 b
30 Gy	185,01±29,05 b
40 Gy	206,40±36,56 a
50 Gy	208,47±30,42 a
60 Gy	207,90±28,86 a

*Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa

Ao comparar-se os valores de microdureza, nas diferentes profundidades, pôde-se observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles, sendo observado no esmalte superficial os maiores valores de microdureza (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão da microdureza longitudinal (Knoop), nas diferentes regiões do esmalte

GRUPO	MÉDIA ± DP
Esmalte superficial	200,8±46,2a
Esmalte médio	193,3±29,0b
Esmalte profundo	185,8±34,5c

*Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa

Analisando-se a interação dos fatores, ou seja, valores de microdureza nas diferentes profundidades, em função das diferentes doses de irradiação, observou-se que no esmalte superficial os valores de microdureza após as doses de 40, 50 e 60 Gy apresentaram-se maiores e estatisticamente diferentes do controle e das doses de 10 Gy, 20 e 30 Gy ($p < 0,05$). Nas doses de 10, 20 e 30 Gy os valores de microdureza diminuíram em relação ao esmalte não irradiado, sendo essa diminuição estatisticamente significativa nas doses de 10 e 20 Gy ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Na região correspondente ao esmalte médio verificou-se que os valores de microdureza após a dose 60 Gy não foram estatisticamente diferentes dos valores de microdureza do esmalte não irradiado e nem dos valores de microdureza nas doses de 10, 30, 40 e 50 Gy ($p > 0,05$). Na dose de 20 Gy, observou-se os menores valores de microdureza, os quais foram estatisticamente diferentes dos

valores de microdureza nas doses de 10, 30, 40, 50 e 60 Gy e também do esmalte não irradiado ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Finalmente, na região correspondente ao esmalte profundo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de microdureza, nas diferentes doses de irradiação, e nem com relação ao esmalte não irradiado ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão da microdureza longitudinal (Knoop) do esmalte de dentes permanentes, não irradiados e irradiados, após diferentes doses de irradiação, nas diferentes profundidades

	Esmalte superficial	Esmalte médio	Esmalte profundo
Controle (não irradiado)	204,19±53,48 ^b	207,42±33,03 ^A	195,69±46,50 [▲]
Irradiado 10 Gy	175,92±31,70 ^{cd}	183,64±33,14 ^A	174,28±44,37 [▲]
Irradiado 20 Gy	152,34±26,31 ^d	170,42±35,24 ^B	172,54±36,73 [▲]
Irradiado 30 Gy	183,37±36,37 ^{bc}	184,89±25,75 ^A	186,78±26,33 [▲]
Irradiado 40 Gy	232,05±43,20 ^a	199,58±21,45 ^A	187,56±27,75 [▲]
Irradiado 50 Gy	227,64±32,86 ^a	207,53±15,54 ^A	190,25±29,30 [▲]
Irradiado 60 Gy	230,42±29,44 ^a	199,50±16,66 ^A	193,78±25,68 [▲]

*Letras e símbolos diferentes representam diferença estatisticamente significativa

4.1.2 DENTINA

Na análise dos dados pôde-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A microdureza na dentina não irradiada (controle) não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com a microdureza na dose de 40 Gy ($p > 0,05$) e apresentou valores de microdureza superiores aos observados nas doses de 10, 20, 30, 50 e 60 Gy ($p < 0,05$) (Figura 2 e Tabela 5).

Figura 2. Valores médios da microdureza longitudinal (Knoop) na dentina não irradiada e após as diferentes doses de irradiação.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão da microdureza longitudinal (Knoop) na dentina não irradiada e após as diferentes doses de irradiação.

GRUPO	MÉDIA ± DP
Controle	28,46±8,19a
10 Gy	23,65±7,86c
20 Gy	23,53±6,91c
30 Gy	24,97±6,07bc
40 Gy	26,47±11,67ab
50 Gy	23,72±6,36c
60 Gy	25,34±6,34bc

*Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante

Ao comparar-se os valores de microdureza, nas diferentes profundidades, pôde-se observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas, sendo observado na dentina média os maiores valores de microdureza (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão da microdureza longitudinal (Knoop) nas diferentes regiões da dentina após irradiação

GRUPO	MÉDIA ± DP
Dentina superficial	25,2±7,9a
Dentina média	29,7±6,1b
Dentina profunda	20,6±6,9c

*Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa

Analisando-se a interação dos fatores, ou seja, valores de microdureza nas diferentes profundidades, em função das diferentes doses de irradiação, observou-se que na dentina superficial os valores de microdureza após as doses de 10, 20, 30, 50 e 60 Gy apresentaram-se menores, porém sem diferença estatisticamente significativa dos valores de microdureza do controle ($p > 0,05$). Na dose de 40 Gy observou-se um aumento dos valores de microdureza, evidenciando-se diferença estatisticamente significativa quando comparados com os valores de microdureza nas doses de 10, 20, 30, 50 e 60 Gy ($p < 0,05$) e sem diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Na região correspondente à dentina média, observou-se uma diminuição significativa nos valores da microdureza ($p < 0,05$) em todas as doses de radiação (10, 20, 30, 40, 50 e 60 Gy) quando comparados com os valores de microdureza da dentina não irradiada ($p < 0,05$). Não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os valores de microdureza após as diferentes doses de radiação ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Finalmente, na região correspondente à dentina profunda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de microdureza, quando comparados nas diferentes doses de irradiação e nem com relação à dentina não irradiada ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Média e desvio padrão da microdureza longitudinal (Knoop) da dentina de dentes permanentes, não irradiados e irradiados, após diferentes doses de irradiação, nas diferentes profundidades

	Dentina superficial	Dentina média	Dentina profunda
Controle (não irradiado)	26,85±4,22 ^{ab}	36,40±6,98 ^A	22,12±5,60 [•]
Irradiado 10 Gy	22,76±6,23 ^b	28,39±7,29 ^B	19,81±7,94 [•]
Irradiado 20 Gy	22,94±6,16 ^b	28,29±5,27 ^B	19,37±6,53 [•]
Irradiado 30 Gy	24,88±1,94 ^b	29,19±4,13 ^B	20,84±7,65 [•]
Irradiado 40 Gy	30,29±17,31 ^a	28,00±5,51 ^B	21,13±7,31 [•]
Irradiado 50 Gy	23,56±64,73 ^b	27,97±4,66 ^B	19,62±6,83 [•]
Irradiado 60 Gy	24,78±3,08 ^b	29,79±5,09 ^B	21,46±7,36 [•]

*Letras e símbolos diferentes representam diferença estatisticamente significante

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

4.2.1 ESMALTE

Na análise morfológica do esmalte, pôde-se observar que os dentes não irradiados apresentaram-se com prismas bem organizados, circundados pelas regiões interprismáticas, observados em secções transversas e oblíquas (Figuras 3A, 4A e 5A).

Nos dentes irradiados observou-se um aumento crescente das alterações na superfície do esmalte nas doses de 30 e 60 Gy, para todas as regiões analisadas nos diferentes aumentos, em comparação ao esmalte não irradiado, ficando a região interprismática mais evidente após as doses de irradiação de 30 e 60 Gy. Entretanto, especificamente com relação à estrutura prismática do esmalte irradiado, não houve dificuldade na observação dos prismas e dos cristais, mesmo após as diferentes doses de irradiação. No entanto, a porção interprismática tornou-se mais evidente após as doses de irradiação de 30 e 60 Gy (Figuras 3B-C, 4B-C e 5B-C).

Figura 3. Eletromicrografias do esmalte de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 5000x. A- esmalte não irradiado com presença de prismas bem organizados e circundados pelas regiões interprismáticas; B (30 Gy) e C (60 Gy) - esmalte irradiado com evidência da região interprismática, sem dificuldade na observação dos prismas e dos cristais.

Figura 4. Eletromicrografias do esmalte de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 10000x. A- esmalte não irradiado com presença de prismas bem organizados e circundados pelas regiões interprismáticas; B (30 Gy) e C (60 Gy) - esmalte irradiado com evidenciação da região interprismática, sem dificuldade na observação dos prismas e dos cristais.

Figura 5. Eletromicrografias do esmalte de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 20000x. A- esmalte não irradiado com presença de prismas bem organizados e circundados pelas regiões interprismáticas; B (30 Gy) e C (60 Gy) - esmalte irradiado com evidência da região interprismática, sem dificuldade na observação dos prismas e dos cristais.

4.2.2 DENTINA

Na análise morfológica da dentina, pôde-se observar que os dentes não irradiados apresentaram-se com túbulos dentinários definidos e com a rede de fibras colágenas bastante organizada (Figuras 6A, 7A, 8A e 9A).

Nos dentes irradiados observou-se um aumento crescente das alterações na superfície da dentina, tanto na dose de 30 Gy, como na de 60 Gy, para todas as regiões analisadas nos diferentes aumentos, em comparação à dentina não irradiada. Com o aumento progressivo das doses de irradiação pôde-se observar alteração da dentina intertubular, peritubular e intratubular. A partir da dose de 30 Gy, nos aumentos de 10000 e 20000 vezes, tornou-se evidente a presença de fendas na estrutura dentinária. Na dose de 60 Gy os túbulos dentinários apresentaram-se “colabados/obstruídos” (Figuras 7C e 8C). Com relação às fibras colágenas observou-se a destruição crescente das mesmas, com o aumento das doses de radiação. No aumento de 20000x evidenciaram-se fibras colágenas fragmentadas (Figuras 9B e 9C).

Figura 6. Eletromicrografias da dentina de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 5000x. A - dentina não irradiada com presença de túbulos dentinários definidos e rede de fibras colágenas organizadas; B (30 Gy) e C (60 Gy) - dentina irradiada com alteração da dentina intertubular, peritubular e intratubular; presença de fendas na estrutura dentinária e túbulos dentinários “colabados/destruídos”.

Figura 7. Eletromicrografias da dentina de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 10000x. A - dentina não irradiada com presença de túbulos dentinários definidos e rede de fibras colágenas organizadas; B (30 Gy) e C (60 Gy) - dentina irradiada com alteração da dentina intertubular, peritubular e intratubular; presença de fendas na estrutura dentinária e túbulos dentinários “colabados/destruídos”.

Figura 8. Eletromicrografias da dentina de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 20000x. A - dentina não irradiada com presença de túbulos dentinários definidos e rede de fibras colágenas organizadas; B (30 Gy) e C (60 Gy) - dentina irradiada com alteração da dentina intertubular, peritubular e intratubular; presença de fendas na estrutura dentinária; túbulos dentinários “colabados/destruídos” e destruição crescente das fibras colágenas.

Figura 9. Eletromicrografias da dentina de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 20000x. A - dentina não irradiada com presença de túbulos dentinários definidos e rede de fibras colágenas organizadas; B (30 Gy) e C (60 Gy) - dentina irradiada com alteração da dentina intertubular, peritubular e intratubular; presença de fendas na estrutura dentinária; túbulos dentinários “colabados/destruídos” e destruição crescente das fibras colágenas, a qual apresentam-se fragmentadas.

4.3 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDX)

Na análise da composição e quantificação dos íons por meio da Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX) foram analisadas as porcentagens dos elementos químicos oxigênio (O), fósforo (P) e cálcio (Ca) no esmalte e na dentina de dentes permanentes irradiados e de seus respectivos controles não irradiados.

As tabelas 8 e 9 apresentam percentual médio de elementos químicos presentes no esmalte de dentes permanentes não irradiados e irradiados (60 Gy).

Tabela 8. Percentual médio de elementos químicos presentes no esmalte de dentes permanentes não irradiados e irradiados (60 Gy)

ELEMENTOS QUÍMICOS	ESMALTE NÃO- IRRADIADO (CONTROLE)	ESMALTE IRRADIADO
Oxigênio (O)	37,09	38,95
Fósforo (P)	19,13	18,55
Cálcio (Ca)	42,95	42,37

Tabela 9. Percentual médio de elementos químicos presentes na dentina de dentes permanentes não irradiados e irradiados (60 Gy)

ELEMENTOS QUÍMICOS	DENTINA NÃO- IRRADIADA (CONTROLE)	DENTINA IRRADIADA
Oxigênio (O)	36,47	38,05
Fósforo (P)	19,17	19,05
Cálcio (Ca)	42,83	42,56

De acordo com os dados obtidos pode-se inferir que houve um discreto aumento na porcentagem de oxigênio, tanto no esmalte como na dentina após 60 Gy de irradiação, quando comparada aos respectivos controles não irradiados. Por outro lado, houve diminuição na porcentagem de fósforo e cálcio, no esmalte e na dentina após 60 Gy de irradiação, em comparação aos controles não irradiados.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 METODOLOGIA

A radioterapia é uma modalidade de tratamento que utiliza radiação ionizante como agente terapêutico (Novaes, 1998; Chaachouay et al., 2011), sendo amplamente utilizada para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço (Adelstein, 2003). A escolha do método radioterápico é influenciada pela localização e profundidade do tumor e, geralmente, para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço é utilizada a terapia de feixe externo (acelerador linear ou gama cobalto) ou radioterapia de intensidade modulada, a qual fornece doses de radiação precisas para um tumor maligno ou áreas específicas dentro do tumor (Specht, 2002; INCA, 2011). No presente estudo, a fim de simular a dose de radiação utilizada nos pacientes oncológicos, utilizou-se o aparelho de telecobaltoterapia.

Dependendo do tumor e do protocolo empregado, as doses para tratamento de câncer variam de 50 a 70 Gy, sendo que a dose comum de irradiação para o tratamento de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço costuma variar entre 60 e 70 Gy. Normalmente a dose é de 2 Gy/dia, por 5 dias na semana, intercaladas por 2 dias sem radiação, correspondentes aos finais de semana, a fim de que os tecidos sadios, adjacentes ao tumor, possam se recuperar (Huber e Terezhalmay, 2003; Vissink et al., 2003; Kielbassa et al., 2006). Neste trabalho, com a finalidade de simular as condições clínicas do tratamento radioterápico de cabeça e pescoço, foi feita a opção pela dose de 60 Gy como preconizado por autores como Anneroth et al.(1985), Jansma et al.(1993), Jham e da Silva Freire (2006) e Otmani (2007), na dose-fração incremental de 2 Gy/dia, respeitando os 2 dias de descanso correspondentes ao final de semana, durante 6 semanas, até uma dose total de 60 Gy. Este protocolo de radiação foi previamente utilizado na literatura por diferentes autores que avaliaram as estruturas dentais em trabalhos *in vitro* (Jansma et al., 1988; 1990; Pioch et al., 1992; Kielbassa et al., 1997; Al-Nawas et al., 2000; Springer et al., 2005; Soares et al., 2010; 2011;

Mellara, 2011), *in situ* (Kielbassa et al., 1999; 2000; Kielbassa, 2000; Al-Nawas et al., 2000) e *in vivo* (Al-Nawas et al., 2000).

Em trabalhos visando avaliar os efeitos da radioterapia sobre as estruturas dentais, *in vitro*, foram empregadas diferentes soluções de armazenamento dos corpos de prova, tais como solução salina a 0,9% (Jansma et al., 1990; Kielbassa et al., 1997; Al-Nawas et al., 2000; Kielbassa et al., 2000), água destilada (Jansma et al., 1988; Soares et al., 2010), solução fosfatada tamponada (Pioch et al., 1992) e saliva artificial (Soares et al., 2011; Mellara, 2011). Neste trabalho, com a finalidade de simular o mais precisamente possível as condições encontradas na cavidade bucal, os espécimes foram mantidos em saliva artificial durante a execução do experimento. Apesar da saliva artificial não reproduzir exatamente as características da saliva natural, principalmente no caso de pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço, onde o fluxo, a secreção e a composição salivar sofrem alterações significativas (Vuolita et al., 2002; Hannig et al., 2006), a opção por essa substância para armazenamento dos dentes se deu pelo fato de que, dentre as possíveis substâncias a serem utilizadas, a saliva artificial é a que mais se assemelha à saliva natural (Amaechi et al., 2001).

A análise das metodologias empregadas nos diferentes estudos que se propuseram a avaliar os danos radiogênicos às estruturas dentais permite verificar a ausência de padronização com relação ao tipo de substrato dental utilizado, sendo empregado ora dentes humanos (Jansma et al., 1993; Kielbassa et al., 1999, 2000; Al-Nawas et al., 2000; Fränzel e Gerlach, 2009; Soares et al., 2010; Soares et al., 2011; Mellara, 2011) e ora dentes bovinos (Jansma et al., 1988, 1990; Pioch et al., 1992; Kielbassa et al., 1997). Também não há padronização em relação à dose e ao protocolo de radiação utilizados (Jansma et al., 1990; Grötz et al., 1997, 1998 e 2001; Kielbassa et al., 1999; 2000; Kielbassa, 2000; Springer et al., 2005; Soares et al., 2010; 2011) e ao tipo de estudo, que é realizado ora *in vitro* (Jansma et al., 1988; 1990; Pioch et al., 1992; Kielbassa et al., 1997; Springer et al., 2005; Soares et al., 2010; 2011; Mellara, 2011), ora *in situ* (Kielbassa et al., 1999; 2000; Kielbassa, 2000) e ora *in vivo* (Al-Nawas et al., 2000). No presente estudo optou-se pelo uso de dentes permanentes humanos, *in vitro*, utilizando-se irradiação com cobalto-60 (Co-60), com finalidade de avaliar seus efeitos deletérios em relação às propriedades mecânicas, morfológicas e químicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes por meio respectivamente da análise da

microdureza longitudinal, da microscopia eletrônica de varredura e da espectroscopia dispersiva de raios X.

5.2 ESMALTE

O esmalte dentário é o tecido mineralizado mais duro do corpo humano, apresentando 96% de conteúdo inorgânico em peso, associado a 4% de água e material orgânico. A porção mineral é composta por fosfato de cálcio cristalino e apatita, nas formas de hidroxiapatita, apatita carbonatada ou apatita fluoretada (Stack, 1954; Meckel et al., 1965; Gwinnett, 1992; De Menezes Oliveira et al., 2010). O fosfato e o cálcio são os elementos químicos que compõem a base desse tecido dental (Brudevold et al., 1963). Entretanto, podem ocorrer variações secundárias na sua composição, podendo ser identificados elementos químicos como alumínio, bário, estrôncio e vanádio (Gwinnett, 1992; Saleh et al., 2004). Apesar de quase todo o volume do esmalte ser ocupado por cristais de hidroxiapatita densamente reunidos, o material orgânico, que forma uma fina rede, aparece entre os cristais. O corpo do material orgânico é composto pelo polipeptídeo amelogenina, rico em tirocina, uma sequência de peptídeos firmemente ligados aos cristais de hidroxiapatita, assim como por proteínas não-amelogeninas (Ten-Cate et al., 2008).

Com relação à microdureza longitudinal do esmalte, como um todo, em função das diferentes doses de irradiação, os resultados do presente estudo mostraram que a irradiação proporcionou a diminuição da microdureza nas doses de 10, 20 e 30 Gy. Nas doses acima deste valor (40, 50 e 60 Gy), a microdureza aumentou e apresentou-se semelhante à do esmalte não irradiado. O resultado verificado ao final deste experimento (após dose de 60 Gy) diverge do estudo prévio de Poyton (1968), realizado também em dentes permanentes, o qual verificou que a microdureza do esmalte irradiado foi menor que do esmalte não irradiado (Poyton, 1968). Entretanto, concorda com o de outros estudos que não observaram alterações da microdureza do esmalte após irradiação (Shannon et al., 1978; Markitziu et al., 1986; Jansma et al., 1988; Kielbassa et al., 1999).

Quando avaliou-se a microdureza, considerando-se as diferentes regiões do esmalte, após diferentes doses de irradiação, pôde-se verificar que o esmalte superficial, após a dose de 40 Gy, apresentou valores de microdureza maiores que o das regiões média e profunda. Entretanto, a ausência de outros estudos na literatura avaliando a microdureza do esmalte em diferentes profundidades (superficial, médio e profundo), após diferentes doses de irradiação (10 Gy a 60 Gy), não permite a comparação direta dos resultados obtidos neste estudo.

O esmalte dental é organizado em prismas, cuja orientação determina o comportamento anisotrópico do esmalte e influencia suas propriedades mecânicas (Urabe et al., 2000; Giannini et al., 2004). No presente estudo, após radiação cumulativa de 30 e 60 Gy, observou-se alterações morfológicas na estrutura do esmalte em comparação à amostra não irradiada, sendo verificado que a porção interprismática ficou mais evidente com o acréscimo das doses de irradiação.

A alteração da estrutura prismática do esmalte dental após irradiação com dose única ou cumulativa, *in vitro*, de 1M-rad, foi verificada por Jervoe, em 1970, o qual observou mudanças na estrutura cristalina do esmalte de dentes de humanos. Essas alterações possivelmente se devem, segundo o autor, não somente ao efeito da radiação dentro da estrutura do cristal, mas também que o efeito dentro do cristal seja resultado de uma reação química causada por radiólise. Vale ressaltar que a dose utilizada por Jervoe (1970) é incompatível com a vida, num tratamento radioterápico. No presente estudo, utilizamos doses menores e fracionadas e, pudemos observar alterações na estrutura do esmalte após irradiação, com evidência da região interprismática.

Grotz et al., em 1998, realizaram um estudo avaliando as alterações do esmalte dental humano *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, após diferentes doses de radiação, e verificaram alterações micromorfológicas no esmalte irradiado. Apesar de diferenças relacionadas à dose de irradiação e à metodologia empregada, nossos resultados concordam com os obtidos por estes autores, uma vez que também observamos alterações micromorfológicas após irradiação, caracterizada pela evidência da região interprismática.

Em 1976, Zach avaliou os efeitos da radiação com dose única de 12000 rads, sobre dentes humanos, por meio de difração de raios-X, e não verificou alterações na cristalinidade. Jansma et al. (1988) avaliaram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, o efeito da irradiação (2 Gy, durante 12

dias, até total de 72 Gy), sobre o esmalte dental bovino e também não verificaram alterações na estrutura cristalina do esmalte, sugerindo que a radiação não apresenta efeitos diretos na estrutura inorgânica de dentes humanos, e que as alterações dentais observadas após a radioterapia de pacientes com câncer de cabeça e pescoço se devam mais a mudanças na matriz orgânica que na matriz inorgânica do esmalte. No presente estudo, a MEV permitiu evidenciar maiores alterações na região interprismática, a qual corresponde a sua matriz orgânica. A nosso ver, as alterações na matriz orgânica do esmalte dos dentes após radiação devem contribuir para os problemas dentais observados posteriormente à radioterapia de cabeça e pescoço.

De acordo com Baker (1982) a radiação, por ocasionar alterações nas ligações protéicas, influencia mais intensamente a região interprismática do esmalte, na qual se concentra sua fase protéica, que a região prismática. Na região interprismática do esmalte se concentra também a água (Ten-Cate, et al., 2008). A radiação ionizante, ao atingir o meio biológico (tecido ou célula), pode atuar direta ou indiretamente, sendo que o efeito direto causa mudanças na estrutura molecular que levam à morte celular. Já o efeito indireto ocorre quando a radiação interage com moléculas de água, resultando na produção de radicais livres instáveis e altamente reativos ou de espécies reativas de oxigênio, que podem reagir com biomoléculas produzindo danos teciduais e celulares (Fang et al., 2002). No presente trabalho as alterações no esmalte atingiram principalmente a região interprismática, ficando esta mais evidente. Possivelmente as alterações identificadas na região interprismática, região esta que concentra água, sejam resultado da formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que podem interagir com os componentes orgânicos e danificá-los.

No presente estudo, as alterações ocorridas na região interprismática do esmalte, após irradiação, podem ter influenciado no aumento da microdureza, após a dose de 40 Gy. Uma possível explicação para este aumento, pode ter sido o fato dos dentes, no presente estudo, terem sido armazenados em saliva artificial durante todo o período experimental, renovada diariamente, diferentemente de outros autores que não verificaram o referido aumento e armazenaram seus dentes em solução salina (Markitziu et al., 1986; Kielbassa et al., 1999), em solução de fluoreto de sódio a 2% (Markitziu et al., 1986) ou em água destilada (Jansma et al., 1988). A saliva artificial possui em sua formulação componentes tais como fosfato

diácido de potássio, fosfato dibásico de potássio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, fluoreto de sódio, sorbitol 70%, aromatizante, conservantes (nipagin/nipasol), espessante e água. Assim, supõe-se que alguns destes componentes possam ter se depositado sobre a estrutura dental e contribuído para o aumento da microdureza, os quais após a dose de 40 Gy aumentaram, tornando-se semelhantes ao esmalte não irradiado.

Embora o esmalte apresente conteúdo orgânico menor que 1% do volume, alterações deste conteúdo podem afetar as propriedades mecânicas do substrato (Jameson et al., 1993; Spears, 1997; White et al., 2001; Zhou e Hsiung, 2006; Baldassarri et al., 2008). A matriz orgânica do esmalte maduro é primeiramente composta de proteína residual (Glimcher et al., 1964; Belcourt e Gillmeth, 1979; Yamakoshi et al., 2006) e, de acordo com estudos de Baldassarri et al. (2008), as proteínas da matriz do esmalte são essenciais não apenas durante a amelogênese, mas também desempenham um papel funcional na maturidade do tecido. Tal fato foi comprovado por estudo que determinou a influência do conteúdo orgânico e do conteúdo de água do esmalte (de 4% a 5%) na microdureza e na resistência à fratura do esmalte de incisivos de ratos, onde estes componentes foram seletivamente removidos. Os autores verificaram que a remoção da matriz orgânica resultou em aumento de 23% na microdureza, em diminuição de 46% da resistência à fratura e no enfraquecimento drástico da junção amelodentinária, enquanto que a remoção da água teve um efeito menor nestas propriedades. Assim, uma vez que a radiação ionizante é capaz de degradar fibras colágenas da dentina (Fisher et al., 1971; Pioch et al., 1992) suspeita-se que a mesma seja capaz de degradar também proteínas do esmalte, e esta degradação talvez contribua para modificações na microdureza do esmalte. Ainda, a radiação também pode causar alterações no conteúdo de água dos tecidos (Guy-Poyto e Pharoah, 1989) e, de acordo com Baldassarri et al. (2008) pode-se supor que a desidratação do tecido leva à rigidez da matriz orgânica e assim, aumenta a microdureza afetando a capacidade do esmalte de absorver e dissipar energia de impacto tornando-se mais friável. No presente estudo, as maiores alterações foram verificadas na região interprismática, a qual concentra a porção orgânica do esmalte dental.

Por meio da espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX), o conteúdo mineral do esmalte dos dentes permanentes foi quantificado no presente

estudo, com auxílio de microanálise, a fim de observar o comportamento de alguns elementos como o oxigênio, o fósforo e o cálcio. No esmalte irradiado, após a dose de 60 Gy, observou-se um discreto aumento na quantidade de oxigênio e uma pequena diminuição nas quantidades de fósforo e cálcio. Nossos resultados assemelham-se aos de Zach (1976) que verificou ausência de alteração na proporção do conteúdo de Ca/P de dentes humanos, após dose única de 1200/rads. No entanto, Zach avaliou todo o tecido dentário e não o esmalte isoladamente. A discreta diminuição da quantidade de cálcio e fósforo, observada no presente estudo, pode ser devido a modificações na solubilidade do esmalte dental após irradiação, o qual se tornando mais solúvel perderia íons para o meio (saliva artificial). Por outro lado, o aumento da solubilidade do esmalte não foi observado por Joyston-Bechal (1985) e por Jansma et al. (1988), os quais verificaram a diminuição da desmineralização subsuperficial do esmalte após irradiação, e atribuíram esse acontecimento à diminuição da solubilidade. Já em 1990, Jansma et al. realizaram um outro estudo onde verificaram que a irradiação não modificou a permeabilidade do esmalte, e atribuíram as modificações químicas da fase inorgânica do esmalte, às alterações na diminuição da desmineralização sub-superficial após irradiação. Assim, outra explicação para a diminuição dos conteúdos de cálcio e fósforo no presente estudo, poderiam ser as modificações químicas da fase inorgânica do esmalte após irradiação. Ainda, de acordo com Jervoe (1970), a radiação é capaz de ocasionar alterações químicas nos cristais devido à radiólise. De acordo com Driessens e Verbeek (1989), os cristais de apatita do esmalte dental incorporam sódio, carbonato e magnésio durante a sua formação e a irradiação, segundo Jansma et al. (1990), provavelmente mobiliza os defeitos pontuais dentro da apatita e assim, íons podem ser removidos das superfícies dos cristais através de soluções aquosas no interior dos poros do esmalte.

Ainda, buscando explicações para as alterações do conteúdo mineral após irradiação do esmalte, podemos recorrer às alterações estruturais observadas no presente estudo na MEV, onde verificamos que a irradiação causou alterações no esmalte, com aumento dos espaços interprismáticos, e como os espécimes foram armazenados em saliva artificial, suspeita-se que possa ter ocorrido tanto a perda quanto o ganho de íons. Entretanto, como o método utilizado (EDX) só permite a análise dos elementos químicos presentes no tecido, não se sabe se os elementos

apresentam um aumento da quantidade de fase química ou a formação de uma nova fase, sendo necessários mais estudos para elucidar esses processos.

A extrapolação clínica dos resultados de estudos *in vitro* ou *in situ* que avaliaram os efeitos da radiação sob o esmalte dental deve ser cautelosa, considerando-se o fato de que é difícil reproduzir *in vitro* e *in situ* todas as alterações clínicas e as respostas individuais de cada paciente aos efeitos da radioterapia, podendo-se citar entre eles as alterações do fluxo salivar, da composição da microbiota bucal e da dieta (Jansma et al., 1988; Kielbassa et al., 1999; 2000).

5.3 DENTINA

A dentina é o tecido mineralizado que corresponde ao maior volume do dente. A dentina madura é composta, quimicamente, por peso, por aproximadamente 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água, adsorvida na superfície do mineral ou nos interstícios entre os cristais. O componente inorgânico consiste em hidroxiapatita na forma de pequenas lâminas. O orgânico consiste em 90% de colágeno principalmente do tipo I, com pequenas quantidades dos tipos III e V. As proteínas não colagênicas da matriz ocupam o espaço entre as fibrilas colágenas e acumulam-se ao longo dos túbulos dentinários (Ten-Cate, et al., 2008).

No presente estudo, em função da sua composição distinta em relação ao esmalte, o comportamento do tecido dentinário foi bastante diferente. Com relação à microdureza longitudinal observou-se neste tecido, como um todo, e em função das diferentes doses de irradiação, uma diminuição significativa de seus valores, exceto na dose de 40 Gy, na qual a dentina apresentou dureza similar à dentina não irradiada. Nossos resultados assemelham-se aos de Markitziu et al. (1986), os quais observaram diminuição da microdureza da dentina de dentes de humanos, após irradiação com cobalto-60. Concordam também com os resultados de Kielbassa et al. (1997), que observaram diminuição da microdureza da dentina de dentes de bovinos, após irradiação com acelerador linear, na dose de 60 Gy.

Na análise individual de cada região da dentina (superficial, média e profunda), após irradiação, observou-se que houve diferença significativa entre as regiões. Na dentina superficial e profunda os valores de microdureza após as diferentes doses de radiação não apresentaram diferença estatística, quando comparados com o controle. Na região correspondente à dentina média, observou-se uma diminuição significativa nos valores da microdureza em todas as doses de radiação, quando comparados com os valores de microdureza da dentina não irradiada. Desse modo, observou-se que a irradiação influenciou apenas a microdureza da região média da dentina. Em função da ausência de outros estudos que tenham avaliado a influência da irradiação na microdureza da dentina de dentes permanentes, em diferentes profundidades, a comparação direta de nossos resultados se torna inviável. Entretanto, Mellara realizou, em 2011, uma pesquisa com metodologia semelhante à do presente estudo, empregando dentes decíduos, e observou que a irradiação ocasionou a diminuição dos valores de microdureza apenas na região próxima à junção amelodentinária, ou seja, na região correspondente à dentina superficial. Esse resultado diverge do resultado do presente estudo, no qual observou-se uma diminuição nos valores da microdureza apenas na dentina média. Talvez essa diferença seja oriunda do fato de um estudo ter sido realizado em dentes decíduos e o outro em dentes permanentes, pois é fato conhecido na literatura específica que existem variações entre estes dentes com relação à composição química, a morfologia e as características fisiológicas (Garberoglio e Brännström, 1976; Koutsi et al., 1994; Sonju Clasen e Ruyter, 1997; Ankger et al., 2004; Oliveira, 2009; Mantovani, 2011).

Na MEV, observaram-se alterações morfológicas na dentina de dentes permanentes após irradiação cumulativa com doses de 30 e 60 Gy. Em comparação à dentina não irradiada verificou-se uma desorganização crescente, caracterizada pela degradação da rede de fibras colágenas e alterações na dentina como um todo, observando-se “fendas” à medida que aumentou a dose cumulativa de radiação, sugerindo um aumento da friabilidade do tecido. Observou-se, ainda, com o aumento da dose de irradiação, que os túbulos dentinários pareciam “colabados/destruídos”. Grötz et al. (1997) atribuíram a obliteração dos túbulos dentinários, em dentes permanentes irradiados, à degeneração dos processos odontoblásticos sendo essa degeneração, segundo os autores, resultado do dano radiogênico direto às células, com redução do metabolismo, particularmente na

área terminal dos odontoblastos. No presente estudo, no qual utilizamos dentes extraídos e portanto sem atividade odontoblástica, acreditamos que a desorganização do tecido dentinário tenha sido oriunda da fragmentação da rede de fibras colágenas. Estes achados podem, talvez, ser a explicação para a diminuição progressiva da microdureza do tecido dentinário, com aumento da dose de irradiação, visto que as alterações morfológicas também foram crescentes. De acordo com Mantovani (2011), a dentina é um substrato consideravelmente complexo e o desequilíbrio entre os componentes minerais e orgânicos pode comprometer suas propriedades mecânicas, tais como elasticidade e dureza.

A alteração da estrutura dentinária de dentes permanentes irradiados foi observada, previamente por Soares et al. (2010), ao estudarem o efeito da radiação ionizante sobre a resistência à tração da dentina em relação à localização e orientação dos túbulos dentinários. Terceiros molares humanos foram submetidos à radiação ionizante com 60 Gy e avaliados por meio de testes de microtração, e comparados com dentes não irradiados. O tecido dentinário radicular e coronário, não irradiados, apresentaram resistência à microtração significativamente maior, quando avaliados perpendicularmente à orientação dos túbulos. No entanto, após irradiação, a orientação dos túbulos não influenciou a resistência à tração indicando, segundo os autores, que a irradiação foi prejudicial aos componentes orgânicos e afetou as propriedades mecânicas da dentina. No presente estudo, embora o teste empregado tenha sido de microdureza, a irradiação também afetou propriedades mecânicas da dentina, tendo sido verificada diminuição progressiva da microdureza com o aumento das doses de irradiação, e também parece ter afetado os componentes orgânicos da dentina, fato este demonstrado pela MEV, onde nos maiores aumentos observa-se a fragmentação da rede de fibras colágenas.

Segundo Açil et al. (2007) a irradiação foi capaz de ocasionar dano direto sobre o colágeno, o qual sofreu desnaturação após irradiação de tecido ósseo de mandíbulas de porco. Embora existam diferenças entre os experimentos de Açil et al. (2007) e o nosso, com relação ao tecido avaliado, respectivamente osso e dentina, e o modelo experimental, mandíbulas de porco e tecido e dentes de humanos, em ambos os estudos observou-se que o colágeno sofre alterações significativas após irradiação.

De acordo com Chistiakov et al. (2008) a irradiação de proteínas ocasiona alterações em suas estruturas secundárias e terciárias tendo, provavelmente, efeito prejudicial sobre a hidratação das fibras colágenas pela ação de radicais livres. No presente estudo, observou-se “fendas” nas estruturas dentinárias e também a fragmentação de fibras colágenas, após as doses de 30 e 60 Gy, talvez resultantes da perda de hidratação das fibras colágenas, o que tornou o tecido ressequido e friável.

Com relação à microdureza do esmalte e da dentina após radiação, observamos comportamentos diferentes entre os dois tecidos. Uma possível explicação pode ser o fato da dentina apresentar em sua composição maior conteúdo aquoso que o esmalte, sendo este na dentina de 10% e no esmalte de 4%, por peso (Ten-Cate, et al., 2008; Mjör, 2009). Sabe-se que a radiação atua sobre a água, levando à formação de radicais livres e peróxido de hidrogênio (Cole e Silver, 1963; Fisher et al., 1971) e, sendo assim, um tecido com maior conteúdo aquoso estaria mais vulnerável aos efeitos da radiação que outro com menor conteúdo, o que poderia vir a influenciar de maneira mais intensa as propriedades mecânicas do tecido. Esse fato foi observado no presente estudo onde verificamos que, de maneira geral, os valores de microdureza da dentina diminuíram após aplicação da radiação. No esmalte, também de maneira geral, não houve alteração nos valores de microdureza.

Soares et al. (2011) realizaram um estudo no qual verificaram que após irradiação ocorreu redução da resistência à tração de materiais resinosos à dentina, e que o uso de clorexidina a 0,12% foi capaz de prevenir parcialmente os danos às propriedades mecânicas da dentina dos dentes irradiados, quando testada com relação à resistência à tração. De acordo com Hebling et al. (2005) e Carrilho et al. (2007), a clorexidina previne a degradação do colágeno dentinário e mantém as propriedades morfológicas desse substrato. No presente estudo observou-se uma diminuição da microdureza na dentina irradiada e, sendo assim, sugerimos que novos estudos sejam realizados com a finalidade de avaliar se a clorexidina a 0,12% e o fluoreto de sódio a 0,05% poderiam ser capazes de evitar alterações da microdureza destes tecidos, após irradiação.

Por meio da espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX), no presente estudo foi quantificado o conteúdo mineral da dentina de dentes permanentes antes e após irradiação. De acordo com os resultados obtidos pôde-

se inferir que houve um discreto aumento na porcentagem de oxigênio e uma diminuição na porcentagem de fósforo e cálcio, após 60 Gy de irradiação, quando comparada com o grupo controle não irradiado. Essas alterações foram de pequena magnitude e em virtude da ausência de outros trabalhos que tenham efetuado análises semelhantes, no tecido dentinário, antes e após radiação com cobalto-60, a comparação direta de nossos resultados torna-se inviável. Sugerimos que novos estudos sejam realizados a fim de comprovar esses resultados preliminares.

Na literatura específica, os estudos que avaliaram alterações do esmalte e dentina de dentes permanentes, antes e após irradiação (Al-Nawas et al., 2000; Shaw et al., 2000; Al-Nawas e Grotz, 2006; Kielbassa et al., 2006), foram realizados *in vitro* ou *in situ*. Como já abordamos, é importante ressaltar que estudos *in vitro*, e até mesmo os *in situ*, não reproduzem de modo adequado todas as alterações clínicas, tampouco as respostas individuais de cada paciente aos efeitos da radioterapia, incluindo as alterações do fluxo e pH salivar, da composição da microbiota bucal e do padrão de dieta. Sendo assim, enfatizamos que estudos adicionais, principalmente *in vivo*, sejam realizados, a fim de determinar as alterações que a irradiação pode ocasionar nas estruturas dentais, e de como estas alterações podem interferir na inter-relação dessas estruturas com os materiais restauradores. Embora estudos *in vitro* tentem reproduzir as condições encontradas na cavidade bucal, realizando armazenamento das amostras em saliva, manutenção dos dentes em estufa, entre outros cuidados, esses não conseguem mimetizar plenamente o que realmente ocorre no organismo vivo.

No presente estudo não ocorreu alteração da microdureza do esmalte como um todo após radioterapia, entretanto, quando analisada em diferentes profundidades, observou-se que a microdureza no esmalte superficial foi maior que a microdureza desta mesma região previamente ao tratamento radioterápico. Talvez este tecido superficial com microdureza maior seja também mais friável e suscetível à trincas, podendo ocasionar hipersensibilidade dental, assim como favorecer as infiltrações nas restaurações já existentes. Em relação à dentina, como um todo, notou-se diminuição da microdureza após a irradiação. Sabendo-se que a dentina fornece suporte ao esmalte, e estando esta mais amolecida, é possível que este suporte torne-se menos eficiente, contribuindo para a ocorrência de fraturas e trincaduras de esmalte. Na dentina observou-se ainda a aparente

degradação da porção orgânica o que talvez possa interferir com a adequada adesão de materiais restauradores resinosos. Dessa forma preconizamos que ao atuar com pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço, o profissional necessite saber que as alterações nas estruturas dentais são oriundas não somente dos danos causados pela radiação às glândulas salivares e às mudanças alimentares, mas também aos danos diretos desse tratamento aos tecidos dentais, e que ao realizar restaurações tanto previamente, quanto após o tratamento radioterápico, o comportamento dos materiais restauradores pode ser diferente do verificado em tecidos dentais não irradiados.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e metodologias empregadas no presente estudo, concluiu-se que a irradiação de dentes permanentes com Co-60:

Não influenciou a microdureza do esmalte, como um todo, entretanto, quando analisou-se a microdureza nas diferentes profundidades do esmalte, verificou-se um aumento da microdureza na região superficial. Com relação à dentina, como um todo, verificou-se, após irradiação, diminuição da microdureza. Quando analisou-se a microdureza nas diferentes profundidades verificou-se diminuição da microdureza apenas na dentina média.

Ocasionou alterações morfológicas progressivas das estruturas do esmalte e da dentina com o aumento das doses de irradiação, visualizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. No esmalte irradiado a porção interprismática tornou-se mais evidente após irradiação. Com relação à dentina, após irradiação, pode ser observada a presença de fendas, túbulos dentinários “colabados/destruídos” e fragmentação progressiva das fibras colágenas.

Ocasionou um discreto aumento na porcentagem de oxigênio e diminuição nas porcentagens de fósforo e cálcio tanto no esmalte e como na dentina de dentes irradiados, verificadas por meio da espectroscopia de energia dispersiva de raios X.

Referências

REFERÊNCIAS

- Açil Y, Springer IN, Niehoff P, Gassling V, Warnke PH, Açmaz S, Sönmez TT, Kimmig B, Lefteris V, Wiltfang J. Proof of direct radiogenic destruction of collagen in vitro. *Strahlenther Onkol*. 2007 Jul;183(7):374-9.
- Adelstein DJ. Systemic chemotherapy for squamous cell head and neck cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2003 Dec;4(12):2151-63.
- Aggarwal V. An in vitro evaluation of effect of ionizing radiotherapy on push-out strength of fiber posts under cyclic loading. *J Endod*. 2009 May;35(5):695-8. Epub 2009 Apr 2.
- Al-Nawas B, Grötz KA, Rose E, Duschner H, Kann P, Wagner W. Using ultrasound transmission velocity to analyse the mechanical properties of teeth after in vitro, in situ, and in vivo irradiation. *Clin Oral Investig*. 2000 Sep;4(3):168-72.
- Al-Nawas B, Grötz KA. Prospective study of the long term change of the oral flora after radiation therapy. *Support Care Cancer*. 2006 Mar;14(3):291-6. Epub 2005 Nov 30.
- Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent*. 2001 Jul;29(5):371-6.
- Angker L, Nockolds C, Swain MV, Kilpatrick N. Quantitative analysis of the mineral content of sound and carious primary dentine using BSE imaging. *Arch Oral Biol*. 2004 Feb;49(2):99-107.
- Anneroth G, Holm LE, Karlsson G. The effect of radiation on teeth. A clinical, histologic and microradiographic study. *Int J Oral Surg*. 1985 Jun;14(3):269-74.
- Baker DG. The radiobiological basis for tissue reactions in the oral cavity following therapeutic x-irradiation. A review. *Arch Otolaryngol*. 1982 Jan;108(1):21-4.
- Baldassarri M, Margolis HC, Beniash E. Compositional determinants of mechanical properties of enamel. *J Dent Res*. 2008 Jul;87(7):645-9.
- Belcourt A, Gillmeth S. EDTA soluble protein of human mature normal enamel. *Calcif Tissue Int*. 1979 Nov 6;28(3):227-31.
- Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2005 Apr;15(2):113-20.
- Bulucu B, Avsar A, Demiryürek EO, Yesilyurt C. Effect of radiotherapy on the microleakage of adhesive systems. *J Adhes Dent*. 2009 Aug;11(4):305-9.

- Brudevold F, Savory A, Gardner De, Spinelli M, Speirs R. A study of acidulated fluoride solutions. I. In vitro effects on enamel. *Arch Oral Biol* 1963 Mar-Apr;8:167-77.
- Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007 Jun;86(6):529-33.
- Casiglia J, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent*. 2001 Jan-Feb;49(1):72-82.
- Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G, Rodemann HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol*. 2011 Jun;99(3):287-92. Epub 2011 Jun 30.
- Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol*. 2008;47(5):809-24.
- Cole T, Silver AS: Production of hydrogen atoms in teeth by X-irradiation. *Nature* 1963 Nov 16;200:700-1.
- Craddock HL. Treatment and maintenance of a dentate patient with 'radiation caries'. *Dent Update*. 2006 Oct;33(8):462-4, 467-8.
- Craddock HL. Treatment and maintenance of a dentate patient with 'radiation caries'. *SADJ*. 2008 Nov;63(10):532, 534-7.
- De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech*. 2010 May;73(5):572-7.
- Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*. 2005 Jan;24(1):9-17.
- Driessens FCM, Verbeek RMH: *Biominerals*. Boca Raton, CRC Press, 1989.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002 Oct;18(10):872-9.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917. doi: 10.1002/ijc.25516.
- Fisher BV, Morgan RE, Phillips GO, Wardale HW. Radiation damage in calcium phosphates and collagen: an interpretation of ESR spectra. *Radiat Res*. 1971 May;46(2):229-35.

Fränzel W, Gerlach R. The irradiation action on human dental tissue by X-rays and electrons-a nanoindenter study. *Z Med Phys.* 2009;19(1):5-10.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol.* 1976;21(6):355-62.

Giannini M, Soares CJ, de Carvalho RM. Ultimate tensile strength of tooth structures. *Dent Mater.* 2004 May;20(4):322-9.

Glimcher MJ, Friberg UA, Levine PT. The isolation and amino acid composition of the enamel proteins of erupted bovine teeth. *Biochem J.* 1964 Oct;93(1):202-10.

Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. [New evidence for the etiology of so-called radiation caries. Proof for directed radiogenic damage of the enamel-dentin junction]. *Strahlenther Onkol.* 1997 Dec;173(12):668-76. German.

Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. [Histotomography studies of direct radiogenic dental enamel changes]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 1998 Mar;2(2):85-90. German.

Grötz KA, Riesenbeck D, Brahm R, Seegenschmiedt MH, al-Nawas B, Dörr W, Kutzner J, Willich N, Thelen M, Wagner W. [Chronic radiation effects on dental hard tissue (radiation caries). Classification and therapeutic strategies]. *Strahlenther Onkol.* 2001 Feb;177(2):96-104. German.

Guy-Poyto H, Pharoah MJ. *Oral radiology.* Toronto, Philadelphia: B. C. Decker, 1989; 17-19.

Gwinnett AJ. Structure and composition of enamel. *Oper Dent.* 1992;Suppl 5:10-7.

Hannig M, Dounis E, Henning T, Apitz N, Stösser L. Does irradiation affect the protein composition of saliva? *Clin Oral Investig.* 2006 Mar;10(1):61-5. Epub 2006 Feb 1.

Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005 Aug;84(8):741-6. Erratum in: *J Dent Res.* 2006 Apr;85(4):384.

Hong SX, Cha IH, Lee EW, Kim J. Mandibular invasion of lower gingival carcinoma in the molar region: its clinical implications on the surgical management. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Apr;30(2):130-8.

Huber MA, Terezhalmay GT. The head and neck radiation oncology patient. *Quintessence Int.* 2003 Oct;34(9):693-717.

Instituto Nacional do Câncer – INCA (2011). Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/sobreinca/site/oinstituato> (Acesso em 25/07/2011).

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>. (Acesso em 09/01/2012).

International Agency For Research On Cancer - IARC (2012) World Cancer Report 2008 Disponível em www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php. (Acesso em: 09/01/2012).

International Agency for Research on Cancer (IARC, 2012 - <http://globocan.iarc.fr> (Acesso 09/01/2012).

Jameson MW, Hood JA, Tidmarsh BG. The effects of dehydration and rehydration on some mechanical properties of human dentine. *J Biomech.* 1993 Sep;26(9):1055-65.

Jansma J, Buskes JA, Vissink A, Mehta DM, Gravenmade EJ. The effect of X-ray irradiation on the demineralization of bovine dental enamel. A constant composition study. *Caries Res.* 1988;22(4):199-203.

Jansma J, Borggreven JM, Driessens FC, 's-Gravenmade EJ. Effect of X-ray irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Caries Res.* 1990;24(3):164-8.

Jansma J, Vissink A, Jongebloed WL, Retief DH, Johannes 's-Gravenmade E. Natural and induced radiation caries: A SEM study. *Am J Dent.* 1993 Jun;6(3):130-6.

Jervoe P. X-ray diffraction investigation on the effect of experimental and in situ radiation on mature human teeth. A preliminary report. *Acta Odontol Scand.* 1970 Nov;28(5):623-31.

Jham BC, da Silva Freire AR. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006 Sep-Oct;72(5):704-8.

Joyston-Bechal S. The effect of X-radiation on the susceptibility of enamel to an artificial caries-like attack in vitro. *J Dent.* 1985 Mar;13(1):41-4.

Kielbassa AM, Beetz I, Schendera A, Hellwig E. Irradiation effects on microhardness of fluoridated and non-fluoridated bovine dentin. *Eur J Oral Sci.* 1997 Oct;105(5 Pt 1):444-7.

Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1999 Mar;44(3):243-51.

Kielbassa AM. In situ induced demineralization in irradiated and non-irradiated human dentin. *Eur J Oral Sci.* 2000 Jun;108(3):214-21. (a)

- Kielbassa AM, Schendera A, Schulte-Mönting J. Microradiographic and microscopic studies on in situ induced initial caries in irradiated and nonirradiated dental enamel. *Caries Res.* 2000 Jan-Feb;34(1):41-7. (b)
- Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. Radiation-related damage to dentition. *Lancet Oncol.* 2006 Apr;7(4):326-35.
- Kim ES, Hong WK, Khuri FR. Chemoprevention of aerodigestive tract cancers. *Annu Rev Med.* 2002;53:223-43.
- Koutsi V, Noonan RG, Horner JA, Simpson MD, Matthews WG, Pashley DH. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. *Pediatr Dent.* 1994 Jan-Feb;16(1):29-35.
- Labbate R, Lehn CN, Denardin OV (2003). Effect of chlorhexidine mouth-wash on radiation induced mucositis in head and neck câncer. *Rev Bras Otorhinolaryngol* 69:349-354.
- Lazarus C, Logemann JA, Pauloski BR, Rademaker AW, Helenowski IB, Vonesh EF, Maccracken E, Mittal BB, Vokes EE, Haraf DJ. Effects of radiotherapy with or without chemotherapy on tongue strength and swallowing in patients with oral cancer. *Head Neck.* 2007 Jul;29(7):632-7.
- Lyons A. Current concepts in the management of oral cancer. *Dent Update.* 2006 Nov;33(9):538-9, 542-5.
- Mantovani CPT Análise das propriedades físicas e químicas da dentina de dentes decíduos e permanentes 2011. 76 f Tese (Doutorado): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- Markitziu A, Gedalia I, Rajstein J, Grajover R, Yarshanski O, Weshler Z. In vitro irradiation effects on hardness and solubility of human enamel and dentin pretreated with fluoride. *Clinical Prevent Dent.* 1986 Jul-Aug;8(4):4-7.
- Meckel AH, Griebstein WJ, Neal RJ. Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1965 Sep-Oct;10(5):775-83.
- Mellara TS Influência da irradiação com cobalto-60 nas propriedades mecânica, químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes decíduos. 2011. 77f. Tese (Mestrado): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009;20(1):3-16.
- Novaes PERS. Radioterapia. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyasu H, Kowalski LP, editors. *Bases da oncologia.* 1 ed. São Paulo: ED. Marina;1998.

Ohrn KE, Wahlin YB, Sjöden PO. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. *Support Care Cancer*. 2001 Jun;9(4):247-57.

Oliveira MAHM. Comparação dos aspectos morfológicos e químicos de esmalte e dentina de dentes decíduos e permanentes. 2009. 80f. Tese (Doutorado): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Otmani N. Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children. *J Can Dent Assoc*. 2007 Apr;73(3):257-61.

Pioch T, Golfels D, Staehle HJ. An experimental study of the stability of irradiated teeth in the region of the dentinoenamel junction. *Endod Dent Traumatol*. 1992 Dec;8(6):241-4.

Pistoia, A. D., Pistoia, G. D., Neto, M. M., Hahn, D., Rigodanzo, L. Manifestações bucais decorrentes do tratamento antineoplásico. *Revista de Dentística* v.3, n.9, 2004.

Poyton HG. The effects of radiation on teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1968 Nov;26(5):639-46.

Saleh J, Willke LW, Bassani IA, Kraether L, Molz RF, Santos LA. Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Porto Alegre, 2004.

Silva AR, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. *Caries Res*. 2009;43(1):43-9. Epub 2009 Jan 19. (a)

Silva AR, Alves FA, Berger SB, Giannini M, Goes MF, Lopes MA. Radiation-related caries and early restoration failure in head and neck cancer patients. A polarized light microscopy and scanning electron microscopy study. *Support Care Cancer*. 2009 Apr 17. (b)

Silva JMG. Propriedades químicas e físicas do esmalte de dentes decíduos e permanentes. 2011. 83f. Tese (Doutorado): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PC, Naves LZ, Pereira PN. Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. *J Dent Res*. 2010 Feb;89(2):159-64. Epub 2009 Dec 30.

Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PC, Naves LZ, Pereira PN. Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. *J Dent Res*. 2010 Feb;89(2):159-64. Epub 2009 Dec 30.

Soares CJ, Neiva NA, Soares PB, Dechichi P, Novais VR, Naves LZ, Marques MR. Effects of chlorhexidine and fluoride on irradiated enamel and dentin. *J Dent Res*. 2011 May;90(5):659-64. Epub 2011 Feb 18.

- Sønju Clasen AB, Ruyter IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv Dent Res*. 1997 Nov;11(4):523-7.
- Shannon IL, Wescott WB, Starcke EN, Mira J. Laboratory study of cobalt-60-irradiated human dental enamel. *J Oral Med*. 1978 Jan-Mar;33(1):23-7.
- Shaw MJ, Kumar ND, Duggal M, Fiske J, Lewis DA, Kinsella T, Nisbet T. Oral management of patients following oncology treatment: literature review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Oct;38(5):519-24.
- Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*. 2002 Dec 26;2:37. Epub 2002 Dec 26.
- Spears IR. A three-dimensional finite element model of prismatic enamel: a re-appraisal of the data on the Young's modulus of enamel. *J Dent Res*. 1997 Oct;76(10):1690-7.
- Specht L. Oral complications in the head and neck radiation patient. Introduction and scope of the problem. *Support Care Cancer*. 2002 Jan;10(1):36-9.
- Springer IN, Niehoff P, Warnke PH, Böcek G, Kovács G, Suhr M, Wiltfang J, Açil Y. Radiation caries--radiogenic destruction of dental collagen. *Oral Oncol*. 2005 Aug;41(7):723-8.
- Stack MV. Organic constituents of enamel. *J Am Dent Assoc*. 1954 Mar;48(3):297-306.
- Stokman MA, Spijkervet FK, Burlage FR, Dijkstra PU, Manson WL, de Vries EG, Roodenburg JL. Oral mucositis and selective elimination of oral flora in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: a double-blind randomised clinical trial. *Br J Cancer*. 2003 Apr 7;88(7):1012-6.
- Ten-Cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- Urabe I, Nakajima S, Sano H, Tagami J. Physical properties of the dentin-enamel junction region. *Am J Dent*. 2000 Jun;13(3):129-35.
- Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(3):199-212.
- Vuotila T, Ylikontiola L, Sorsa T, Luoto H, Hanemaaijer R, Salo T, Tjäderhane L. The relationship between MMPs and pH in whole saliva of radiated head and neck cancer patients. *J Oral Pathol Med*. 2002 Jul;31(6):329-38.
- White SN, Luo W, Paine ML, Fong H, Sarikaya M, Snead ML. Biological organization of hydroxyapatite crystallites into a fibrous continuum toughens and controls anisotropy in human enamel. *J Dent Res*. 2001 Jan;80(1):321-6.

Yamakoshi Y, Hu JC, Zhang H, Iwata T, Yamakoshi F, Simmer JP. Proteomic analysis of enamel matrix using a two-dimensional protein fractionation system. *Eur J Oral Sci.* 2006 May;114 Suppl 1:266-71; discussion 285-6, 382.

Zach GA. X-ray diffraction and calcium-phosphorous analysis of irradiated human teeth. *J Dent Res.* 1976 Sep-Oct;55(5):907-9.

Zhou JK, Hsiung LL (2006). Biomolecular origin of the rate-dependent deformation of prismatic enamel. *Appl Phys Lett* 89-51904.

Anexo

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. ATAc. CEP/21111/FORP-USP/06.06.2011
CHLS/fdc

Ref. processo n.º 2011.1.365.58.3
CAAE n.º 0021.0.138.000-11

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 120.ª Sessão, realizada em 26 de maio de 2011, aprovou o desenvolvimento do projeto de pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado "*Avaliação das propriedades do substrato dental de dentes permanentes após irradiação com Co-60*".

Na oportunidade, lembramos da necessidade de serem entregues, na secretaria do CEP, o **Relatório Parcial** em 26/01/2012 e o **Relatório Final** em 26/08/2012, com os respectivos formulários preenchidos pelo pesquisador responsável.

Lembramos ainda que, quando da submissão do relatório a este Comitê, quaisquer inclusões ou modificações no projeto original deverão ser comunicadas e justificadas ao CEP, através do formulário supracitado.

GISELE ELLENE ANDRADE DA DALTI
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.
PROFA. DRA. ALEXANDRA MUSSOLINO DE QUEIROZ
Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social
desta Faculdade

AVENIDA DO CAFÉ, S/N.º - TEL. (16) 3602-4123 / 3963 - FAX (16) 3602-4102
14040-904 - RIBEIRÃO PRETO - SP - BRASIL