

ESTUDO IN VITRO DA COMPOSIÇÃO E MICRODUREZA DE TECIDOS DUROS DA CAVIDADE BUCAL SUBMETIDOS À IRRADIAÇÃO GAMA COM A DOSE PROGRAMADA NO TRATAMENTO DE PACIENTES ACOMETIDOS COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Wilber E. B. Paredes ⁽¹⁾, Sandra Flores Ari ⁽²⁾, Áurea B. C. Geraldo ⁽³⁾, Delvonei Alves de Andrade ⁽⁴⁾

(1) Mestrando em Ciências no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN.

(2) Doutoranda em Estatística no Instituto de Matemática e Estatística IME/São Paulo, Brasil.

(3) Pesquisadora Titular no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN.

(4) Pesquisador Titular no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN.

E-mail: ebernaola@usp.br

RESUMO

A radioterapia clínica é de fundamental importância para o tratamento de lesões malignas localizadas na região de cabeça e pescoço, porém, a exposição à irradiação ionizante, pode levar a complicações sistêmicas ou locais durante e após o tratamento radioterápico. Dentre estas complicações locais imediatas, destaca-se na cavidade bucal a xerostomia e a consequente mucosite oral. A respeito das complicações tardias produzidas pela radioterapia, salientam-se a cárie de irradiação e a osteoradionecrose, lesões dose dependentes, apresentando esta última um alto nível de incidência nas últimas décadas (1-30%) e de difícil manejo, embora estas se apresentem após término do tratamento e sob influência de fatores locais. A metodologia proposta no presente estudo visa analisar o efeito direto da radiação gama após irradiação das amostras de esmalte, dentina e osso mandibular, utilizando-se a taxa de dose empregada em pacientes acometidos com câncer de cabeça e pescoço. As amostras foram previamente preparadas e padronizadas além de serem polidas, e em seguida realizou-se a análise da microdureza de superfície Inicial de todos os grupos. Posteriormente, as amostras foram irradiadas sob uma taxa de dose de dois Gy por dia, completando uma dose total de setenta e dois Gy. Finalmente, as amostras foram submetidas à análise de dureza após irradiação, e à análise morfológica na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, com um nível de significância de 95% ($p < 0,05\%$), através do teste paramétrico de T de *student* para médias relacionadas, encontrando-se um resultado estatisticamente significativo ($p = 0,00$) para os quatro grupos de amostras estudadas. A partir dos resultados preliminares estatísticos, conclui-se que o efeito da radiação gama nos tecidos duros da cavidade bucal foi altamente significativo no que diz respeito à microdureza de superfície, comprovando-se por análise morfológica nas imagens obtidas através do MEV.

ABSTRACT

Clinical Radiotherapy is one of the most important techniques for the treatment of malignant lesions of the head and neck, however, exposure to ionizing radiation can lead to systemic complications or sites during and after radiation treatment. Among these immediate local complications in oral cavity, it stands out the xerostomia and consequent oral mucositis. Regarding late complications produced by radiation, decay of radiation and osteoradionecrosis, both dose-dependent lesions, which mostrate a

high level of incidence in recent decades (1-30%) and unwieldy, although these are presented after completion of treatment and under the influence of local factors. The methodology proposed in this study aims to examine the direct effect of gamma radiation after irradiation of enamel, root dentin and jawbone samples, using the dose rate used in patients suffering with head and neck cancer. Samples were prepared in advance and standardized and are polished, and then underwent the analysis of the initial surface microhardness of all groups. Subsequently, the samples were irradiated in a dose of Gy rate of two per day, completing a total dose of seventy-two Gy. Finally, the samples were analyzed for Microhardness surface after irradiation, by morphological analysis in scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). The data were analyzed statistically with a significance level of 95% ($p < 0.05$), through the parametric Student's t-test for related averages and ANOVA statistical test, finding a statistically significant result ($p = 0.00$) for the four groups of samples. From the preliminary statistical results, it is concluded that the effect of gamma radiation on hard tissues of the oral cavity was highly significant with regard to the microhardness of the surface, proving in the morphological analysis on the images obtained by SEM.

Apoio: Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN / São Paulo Brasil

Palavras- chave: esmalte dentário, radioterapia, osteorradionecrose.

Introdução

A estimativa do câncer para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil novos casos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1 %), intestino (7,8 %), estômago (6,0 %) e cavidade oral (5,2 %). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,0 %), pulmão (5,3 %) e estômago (3,7 %) figurarão entre os principais¹.

O câncer constituiu-se em um problema de saúde pública, por isso, seu controle e prevenção devem ser priorizados no país. Os cânceres se desenvolvem com múltiplas etapas ao longo dos anos, dessa forma, alguns tipos podem ser evitados pela eliminação da exposição aos fatores determinantes. Se o potencial de malignidade for detectado antes das células tornarem-se malignas, numa fase inicial da doença, o tratamento pode ser muito eficaz e com altas probabilidades de cura². Dentre os tratamentos comumente usados no tratamento do câncer, encontra-se a radioterapia, usada amplamente como terapia definitiva ou coadjuvante do procedimento cirúrgico, principalmente, em cânceres da região de cabeça e pescoço³. No entanto, altas doses de radioterapia em áreas de amplas dimensões, tais como a cavidade oral, maxilar superior, mandíbula e glândulas salivares podem resultar em efeitos indesejáveis, de aparecimento imediato ou tardio, onde a osteorradionecrose (ORN) é considerada provavelmente a pior⁴.

A ORN é uma das mais severas e sérias complicações orais do tratamento radioterápico do câncer da cabeça e pescoço. Alguns autores afirmam que, apesar da melhora nos cuidados orais realizados antes da radioterapia, a incidência de ORN não diminuiu significativamente nos últimos anos tendo, ao contrário, aumentado entre 1% a 30%³.

A ORN é definida como o osso necrótico irradiado exposto, o qual não cicatriza, sobre um período de três meses a mais, sem a presença de remanescente tumoral ou recorrência do tumor. Esta entidade patológica pode ser encontrada tanto na região do maxilar superior, quanto na região mandibular, com uma alta taxa de incidência na região do corpo mandibular e região retro molar documentada nos últimos anos^{4,7}. A sintomatologia clássica da ORN consiste em uma dor intolerável, fratura patológica do osso comprometido, sequestros de osso desvitalizado, processos fistulosos, o que produz incapacidade para os pacientes se alimentarem normalmente. A causa de aparecimento da ORN em um tempo menos de dois anos após a radioterapia deve-se às altas doses de radiação de mais de 70 Gy que receberam os pacientes acometidos por câncer de cabeça e pescoço, e concomitantemente a realização de algum procedimento cirúrgico após o tratamento com a radiação ionizante. A radioterapia reduz a proliferação da medula óssea, do tecido periosteal e das células endoteliais quanto à produção dos componentes da matriz extracelular tais como o colágeno⁸.

A patogênese da ORN ainda permanece não esclarecida. Inúmeras teorias baseiam-se nos postulados de Marx, que afirma que esta doença deveria ser considerada como um ferimento no osso que não cicatriza por questões metabólicas e distúrbios homeostáticos. Outros autores consideram que a ORN resulta de um osso que se torna hipóxico, hipovascular e hipocelular por afecção dos vasos sanguíneos, cujo processo é conhecido como a endarterite, e consequentemente obtém-se um tecido desorganizado e friável, que não cicatriza. Atualmente, os autores apontam para uma nova hipótese a respeito da patogênese da ORN, propondo um mecanismo de fibro-atrofia do tecido ósseo induzido pela radiação ionizante, incluindo a formação de radicais livres, disfunção endotelial, inflamação, trombose microvascular, fibrose e remodelação. Como consequência, a progressão da ORN deve-se à ativação e não regulação da atividade fibroblástica que torna o tecido atrofiado dentro da área previamente irradiada.

Dentro dos fatores de risco para o desenvolvimento da ORN, uma dos principais considerados pelos autores é a radiação ionizante, cujas diferentes modalidades incluem: a dose total, a quantidade de energia por fóton, a braquiterapia, o campo de irradiação e o fracionamento da dose. Embora, tenha-se desenvolvido novas modalidades de radioterapia, tais como a Radioterapia de Intensidade Modulada (IMRT), na qual pequenos volumes do maxilar superior e da mandíbula recebem altas doses de radiação, ainda apresentam-se casos de ORN nos pacientes submetidos a estas modalidades terapêuticas pelo qual surge a necessidade de mais estudos para o esclarecimento da patogênese da ORN, especificamente, da ação direta da radiação ionizante sobre os tecidos duros da cavidade oral, e posteriormente, estabelecer futuras modalidades no tratamento e prevenção deste efeito deletério da radioterapia⁴.

De acordo com estudos^{3,4}, a ORN é improvável de aparecer quando a dose de radiação é menor de 70 Gy; porém outros estudos referem-se a um acréscimo na incidência da ORN em pacientes que receberam doses entre 65 a 70 Gy, tendo como dose média 66 Gy³.

Diante da alta incidência (1-30%)^{3,4} da osteorradionecrose que acomete os pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço para o tratamento do câncer, acredita-se que o presente estudo poderá acrescentar dados ainda inéditos na literatura. A osteorradionecrose é uma complicação que diminui a sobrevida do paciente irradiado na medida em que pode causar processos infecciosos, locais e sistêmicos, que se não aumentando a morbidade, diminui consideravelmente a qualidade de vida do paciente irradiado. Adicionalmente a osteorradionecrose pode necessitar de tratamento cirúrgico mutilante. Tendo em vista o supracitado, propõe-se esse estudo para melhor entender o mecanismo de desenvolvimento desta complicação por efeito da radiação ionizante, envolvendo-se todos os tecidos duros da cavidade oral, com a finalidade de determinar *in vitro*, as ações diretas exercidas da radiação gama, como um fator isolado de risco para o desenvolvimento dos efeitos indesejáveis da radioterapia propriamente dita, o que poderá futuramente beneficiar, após novos estudos, o manejo destas complicações do tratamento radioterápico em pacientes acometidos com câncer de cabeça e pescoço.

Embora estudo recente⁵ do Laboratório de Biofotônica do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (São Paulo – Brasil) demonstre que, isoladamente, o esmalte submetido à radiação ionizante pode não ser mais susceptível à desmineralização do que o esmalte não irradiado, isto apenas se observa *in vitro*. No caso da dentina radicular, a qual apresenta maior conteúdo orgânico do que o esmalte; é a mais afetada pela radiação gama em comparação com a dentina coronária, a qual apresenta maior composição mineral, como demonstrado na literatura⁶⁻⁸. No paciente irradiado é extremamente importante que haja uma adequação do meio bucal antes do tratamento radioterápico e que se mantenha alimentação e condições de higienização adequadas durante e após o protocolo de terapia com radiação ionizante. Contudo, a dificuldade de higienização da cavidade oral ocorre nos indivíduos submetidos à radioterapia principalmente pela incidência de mucosite, rigidez muscular ou trismos, e no caso do tecido alveolar, a presença da osteorradionecrose como efeito deletério dose dependente, que podem ocorrer tanto durante e quanto após o tratamento radioterápico^{3,4}.

Ainda que alguns estudos⁹⁻²¹ relatem resultados desfavoráveis nos tecidos da cavidade bucal com maior conteúdo orgânico após tratamento radioterápico; todavia é necessário analisar a quantidade de perda mineral que ocorre nos tecidos duros submetidos à irradiação gama. Considerando que é indispensável investigar estratégias de prevenção que atuem de uma forma mais prolongada nos tecidos irradiados e que estes estudos são inviáveis de realização em um paciente submetido à radioterapia sob o ponto de vista ético, surge a necessidade de desenvolver um protocolo *in vitro*^{14, 23-27}.

A determinação dos efeitos causados pela radiação ionizante, utilizando-se a dose empregada em pacientes acometidos com câncer de cabeça e pescoço, em termos de alteração na composição e

Microdureza dos tecidos duros, fará com que no futuro as possíveis complicações inerentes da radiação sejam diminuídas ou erradicadas, mediante protocolos de fracionamento da dose ou procedimentos preventivos, com dados obtidos em estudos *in vitro*²²⁻³¹.

Desta maneira, este estudo visa determinar, mediante avaliação qualitativa e quantitativa, o efeito direto da radiação gama sobre os tecidos duros da cavidade bucal através da Microscopia Eletrônica de Varredura e a Microdureza de Superfície.

1. Metodologia

1. 1 - Obtenção e preparo das amostras de esmalte e dentina humana

1.1.1 - Corte e obtenção de blocos de esmalte dentário e dentina radicular

No presente estudo foram selecionados 50 terceiros molares humanos hígidos provenientes do Banco de dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP), os quais foram mantidos em solução de Timol (concentração 1 g/ L) por 48 horas e refrigerados a 4°C. Após a descontaminação inicial dos dentes, estes foram colocados num recipiente com água destilada e deionizada para dar início à separação das coroas e raízes, com a finalidade de obter os blocos de esmalte dentário e dentina radicular. Utilizou-se um instrumento de alta rotação com ponta diamantada, realizando-se cortes no nível do limite amelocementário (UAC). Posteriormente, os blocos foram despulpados, ou seja, foi removido todo o tecido orgânico remanescente, empregando-se curetas para raspagem e alisamento radicular (*Millenium 13 MC e 34 retas, 35 curva; Millenium 28* biativa de ponta fina, São Paulo, Brasil). Em seguida, estes foram submetidos à limpeza em ultrassom (Lavadora Ultra Sônica Unique – *Thomton, Unique Ind. E Com. Ltda.*, São Paulo, Brasil) por um período de 30 minutos divididos em dois ciclos de 15 minutos para eliminação de restos orgânicos não removidos completamente. Os blocos foram colocados em béqueres de 200 ml de volume, com água destilada e deionizada e posicionados no centro da cuba da lavadora, previamente abastecida com água, e após o primeiro ciclo de lavagem de 15 minutos, foi feito o descarte da água e realizou-se a troca dos recipientes para o início do segundo ciclo de lavagem. Após o segundo ciclo de lavagem, a água dos recipientes foi novamente desprezada, verteu-se finalmente 20 ml de água destilada e os béqueres foram cobertos com papel alumínio e armazenados sob refrigeração a 4 °C para serem posteriormente analisados macroscopicamente.

Logo depois, os blocos foram submetidos à profilaxia e raspagem rigorosa para eliminar os detritos e o tártaro remanescentes na superfície coronária e radicular, utilizou - se pasta profilática composta de pedra pomes e água destilada, de uso odontológico. Para a profilaxia foi utilizado um micro motor e um contra ângulo de utilidade odontológica (*Dabi Atlante*, São Paulo, Brasil), e em seguida, as raízes foram submetidas a raspagem com curetas para alisamento radicular. Imediatamente depois, as coroas e raízes, foram submetidas à limpeza em ultrassom , por um período de 30 minutos divididos em dois ciclos de 15 minutos como descrito anteriormente, para eliminação de possíveis tecidos orgânicos ou da pasta de pedra pomes utilizada na profilaxia. Posteriormente, os blocos foram secos

com papel absorvente durante 5 minutos à temperatura ambiente para avaliação macroscópica mediante lupa estereoscópica.

Para a análise macroscópica dos blocos obtidos, estabeleceram-se critérios de inclusão e exclusão, os quais incluíram as coroas e raízes isentas de defeitos visíveis e manchas brancas de ambos tecidos duros, excluindo-se os blocos que não cumpriram com as características supracitadas.

No que diz respeito ao corte e obtenção dos blocos de esmalte dentário e dentina radicular, realizou-se a fixação das coroas e raízes selecionadas em uma lâmina de acrílico de aproximadamente 4 cm de largura por 5 cm de diâmetro, na qual utilizou-se cera pegajosa amarela colocada em uma lamparina e aquecida até ela se derreter e foi transportada à lâmina de acrílico mediante um gotejador de metal. Foi colocado um pingo de cera para o posicionamento paralelo de uma das bordas da coroa à borda lateral da lâmina e por último realizou-se a fixação das laterais da coroa. Uma vez fixa a coroa à lâmina, efetuou-se o corte dela em sentido transversal e horizontal na cortadeira manual (*IsoMet.*, *Buehler*, São Paulo, Brasil), com disco diamantado de alumínio de grão fino (*Struers*, São Paulo, Brasil). A coroa a ser cortada foi posicionada quase paralela ao braço maior do equipamento e direcionou-se o disco para o seccionamento da coroa em sentido transversal, com uma distância de 3 mm x 3 mm aproximadamente entre corte e corte até atingir a parte basal da coroa, obtendo - se os blocos de esmalte dental.

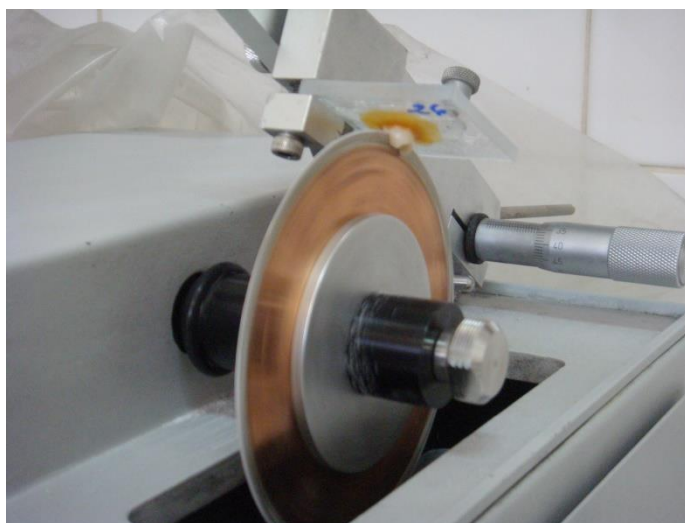


Fig. 1 Corte com disco de alumínio de grão fino para obtenção de blocos de esmalte dentário

Para o corte das raízes, foi realizado o procedimento semelhante ao do esmalte descrito anteriormente, com fixação prévia da raiz e subdividindo-se em três linhas imaginárias a face frontal dela em direção transversal e horizontal. Obtiveram-se, os blocos de dentina radicular de aproximadamente 3 mm x 3 mm.

1.1.2 - Polimento dos blocos de esmalte dentário e dentina radicular

1.1.2. 1 - Polimento dos blocos de esmalte dentário

Uma vez obtidos os blocos de esmalte e dentina radicular, estes foram submetidos ao polimento manual para análise da Microdureza inicial de superfície. Os blocos foram montados na lâmina de acrílico, fixados com cera pegajosa como descrito anteriormente. Para o caso dos blocos de esmalte dentário, foi fixada à lâmina de acrílico, em um primeiro momento, a superfície de esmalte para assim fazer o polimento da dentina remanescente e obter-se uma superfície plana e totalmente paralela às arestas da lâmina em uso. Em seguida, os blocos foram polidos na Politriz, no qual foram usados discos de lixa de gramatura de diferentes grãos: iniciou-se com um disco de 400-800 de grão grosso sob refrigeração durante 15 segundos com uma velocidade de giro de 100 rpm, e a seguir, um disco de 600-1200 sob refrigeração durante 10 segundos com uma velocidade de giro de 100 rpm. Posteriormente, foram usados os discos de 2500 durante 10 segundos e com uma velocidade de 100 rpm, e para finalizar usou-se um disco de grão fino de 4000 durante o tempo e a velocidade anteriormente descritos. O polimento foi completado com o ultra polimento dos blocos com solução diamantada de 1 μm (Buehler, São Paulo, Brasil) sem refrigeração, vertida no disco de feltro e executada com uma velocidade de 300 rpm durante 1 minuto.

O procedimento descrito anteriormente foi realizado para a superfície de esmalte dentário, o qual foi virado pra cima e conseqüentemente a dentina previamente polida foi virada pra lâmina de acrílico, fixando-a com cera pegajosa nas bordas laterais com a precaução de evitar contato entre a cera e o bloco.

Ao finalizar o polimento dos blocos, as amostras obtidas de esmalte dentário foram submetidas à lavagem em ultrassom durante 40 minutos subdivididos em 5 ciclos de 8 minutos cada, e se descartou a água destilada em cada ciclo. Os béqueres com amostras foram cheios de água destilada e deionizada e armazenados durante 24 horas para posterior fixação das amostras na lâmina de acrílico.

1. 1.2.2 - Polimento dos blocos de dentina radicular

Os blocos de dentina radicular foram polidos com a metodologia empregada para os blocos de esmalte como descrito anteriormente. Ambas as superfícies da dentina radicular foram polidas até obter uma superfície plana de aproximadamente 3 mm x 3 mm, realizado na Politriz e com os discos de lixa de gramatura de 400-800, 600-1200, 2500 e 4000 conforme protocolo executado anteriormente. Finalmente, estes foram submetidos ao ultra-polimento com solução diamantada de 1 μm , sem refrigeração, com uma velocidade de 300 rpm durante 1 minuto.

Ao finalizar o polimento dos blocos, as amostras obtidas de dentina radicular foram submetidas à lavagem em ultrassom, como descrito para o caso anterior.

1. 2.- Obtenção e preparo de amostras de osso mandibular suíno

Foram selecionadas mandíbulas suínas de 15 cm de comprimento por 10 cm de largura, fornecidas pela Frigorífica Raia (Carapicuíba, São Paulo, Brasil). As mandíbulas foram lavadas com abundante água destilada e deionizada, em seguida, foram armazenadas em recipientes estéreis no freezer,

para manutenção dos tecidos biológicos não removidos enquanto não utilizados, sob temperatura de -88°C .

Foi realizado o processo de remoção do tecido mole remanescente no Laboratório de Preparo de amostras biológicas do Centro de Lasers e Aplicações, tais como fâscias musculares, músculos e ligamentos pertencentes à estrutura tecidual do animal. Usou-se uma folha de bisturi N° 15, um cabo de bisturi N° 3, ademais de uma pinça sem dentes para o prensado do tecido e exérese definitiva. Foi realizada uma abundante lavagem com água destilada e deionizada após remoção completa dos tecidos remanescentes, obtendo-se uma peça cirúrgica limpa e homogênea superficialmente. Após cada procedimento cirúrgico, as mandíbulas foram envolvidas em um envelope plástico de fechamento hermético e armazenadas sob temperatura de -88°C para preservação das peças cirúrgicas.



Fig. 2 Delimitação da região medial do corpo mandibular de lado esquerdo para obtenção dos blocos de 3x3x1,2 mm



Fig. 3 Delimitação da região interna do trigono retromolar esquerdo para obtenção dos blocos de 3x3x1,2 mm

As peças cirúrgicas foram subdivididas em duas metades para melhor manejo das hemimandíbulas de ambos os lados, direito e esquerdo. Foram obtidos os blocos da região do corpo mandibular, através de corte manual com motor de baixa rotação, com disco diamantado de alumínio e disco de carborundum metálico, pelo qual foi realizada a irrigação abundante com água destilada até a obtenção do bloco final, para assim diminuir o efeito térmico após o corte. No caso dos blocos da região do Trígono retro molar, foi efetivado o procedimento anteriormente descrito.

Após a obtenção dos blocos de ambos os grupos, estes foram submetidos à lavagem em ultrassom para remoção dos tecidos orgânicos remanescentes. Colocaram-se os blocos em béqueres estéreis com água destilada e deionizada, seguindo-se a lavagem durante 5 ciclos de 8 minutos cada, e finalmente foram armazenados sob temperatura de -88°C até serem posteriormente analisados.

1. 2. 1. - Preparo e polimento de amostras de corpo mandibular suíno

Os blocos de corpo mandibular suíno obtidos foram submetidos ao corte vertical e transversal na Cortadeira Manual (*IsoMet, Buehler*, São Paulo, Brasil) para obtenção de blocos menores de 3 mm x 3 mm x 1.2 mm. Foram fixados à lâmina de acrílico com cera pegajosa, com as bordas do osso paralelas às arestas da lâmina. O corte iniciou-se na borda mais externa do bloco e continuou-se até

a borda interna, tendo-se como distanciamento entre corte e corte 3 mm x 3 mm x 1.2 mm. Em seguida, os blocos obtidos foram submetidos à lavagem em ultrassom durante dois ciclos de 15 minutos, e completou-se 30 minutos de lavagem.

Posteriormente, os blocos foram fixados novamente à lâmina de acrílico com cera pegajosa e foi realizado o polimento manual dos mesmos na Politriz. Iniciou-se o polimento com discos de lixa de gramatura de 800, 1200, 2500 e 4000, durante 15 segundos para o primeiro caso e 10 segundos para os subsequentes discos, com uma velocidade de 100 rpm. Finalmente, se realizou o ultra polimento com solução diamantada de 1 µm e disco de feltro seco, sem refrigeração, com uma velocidade de 300 rpm durante 1 minuto. Consequentemente, foi realizada a lavagem em ultrassom para remoção dos restos da solução diamantada. Os blocos foram armazenados em um béquer com água destilada e deionizada, tampado hermeticamente e sob refrigeração de 4 °C durante 24 horas.

1. 2. 2. - Preparo e polimento de amostras da região do Trígono retro molar suíno

Os blocos da região do Trígono retro molar obtidos, foram submetidos ao corte vertical e transversal na Cortadeira Manual (*Isomet.*, Buehler, São Paulo Brasil) para obtenção de blocos menores de aproximadamente 3 mm x 3 mm x 1.2 mm. Realizou-se previamente um desgaste e ajustamento dos blocos, devido à anatomia irregular da região e com a finalidade de facilitarmos a fixação deste na lâmina de acrílico. O desgaste foi feito com discos diamantados de alumínio sob refrigeração montados no motor de baixa rotação de uso odontológico. Logo depois, foi realizada a fixação dos blocos na lâmina de acrílico com cera pegajosa quente. Os blocos foram submetidos ao corte vertical e transversal, com distanciamento entre os cortes de 3 mm x 3 mm com uso de disco diamantado de alumínio de grão fino (*Struers*, São Paulo, Brasil) e sob refrigeração manual com água destilada e deionizada. Posteriormente, estes foram submetidos à lavagem em ultrassom como anteriormente descrito. Em seguida, foi feito o polimento manual na Politriz de ambas as superfícies, segundo o protocolo descrito anteriormente. Logo mais, as amostras foram armazenadas em béquer estéril com água destilada e deionizada, tampado hermeticamente, durante 24 horas. Finalmente, as amostras foram fixas na lâmina de acrílico para análise da Microdureza de superfície inicial (*baseline*).

1. 3 - Análise de Microdureza de Superfície Inicial (*Baseline*)

As amostras obtidas dos quatro grupos de estudo e fixadas na lâmina de acrílico foram submetidas à análise de Microdureza de Superfície Inicial (MDS) com a finalidade de obter-se uma avaliação quantitativa da homogeneidade nas superfícies das amostras após o polimento. Assim, para análise de MDS (*Baseline*), foi utilizado um microdurômetro (*Shimadzu* HMV-200, Japão) provido de indentador *Knoop* que foi programado para aplicar uma carga de 245,2 mN (HK0,025) durante 10 segundos (s) para o caso das amostras de esmalte dentário, e uma carga de 98,4 mN(HK0,01) durante 15 segundos (s) para as amostras de dentina radicular, trígono retro molar e corpo mandibular.

1. 3.1 - Análise de Microdureza de Superfície Inicial (*Baseline*)

Cada amostra de cada grupo foi posicionada no microdurômetro e mantida sem movimentação durante toda a análise. Para cada amostra foram realizadas 15 endentações subdivididas em três filas de 5 endentações, as quais foram separadas em distâncias de 100 μm a partir de uma borda regular, a qual foi previamente selecionada e marcada para futura referência. A distância entre fila e fila foi de 200 μm . Após estas endentações de *baseline*, foi calculada a média e desvio padrão das 15 endentações de cada amostra para verificar se o mesmo era homogêneo com a finalidade de critério de inclusão. Foram realizados gráficos de dispersão no Microsoft Excel (Microsoft Office, 2010) para cada grupo, desta conseguiu-se realizar uma seleção acurada das amostras a serem irradiadas.

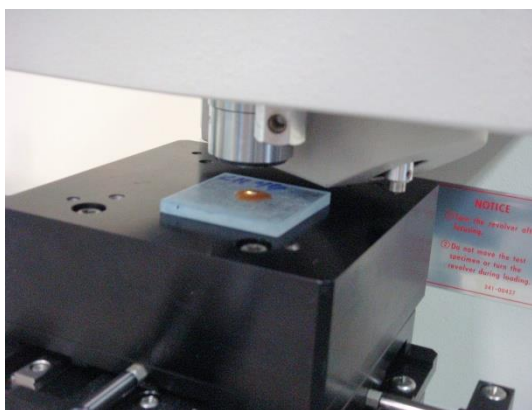


Fig. 4. Análise de Microdureza de Superfície no Microdurômetro através de indentedor Knoop. A amostra fica centralizada perpendicular ao indentedor

1. 4 - Irradiação das amostras

As amostras foram submetidas à irradiação gama no Irradiador de Cobalto-60 (*GammaCell*, Co^{60}) no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN - CNEN/São Paulo, Brasil) segundo protocolo de radioterapia convencional utilizado nos pacientes acometidos por câncer de cabeça e pescoço. As amostras foram colocadas em placas de Petri de material resinoso para cultivo, e em seguida, estas foram submersas em campos de algodão umedificados com uma solução de Timol diluído em água destilada (0.641 g / 1litro de água destilada), com a finalidade de manter o ambiente úmido e evitar a proliferação de fungos.

1. 4.1 - Estudo piloto para determinação da taxa de dose

Para determinar a taxa de dose a ser empregada no estudo foi realizado um estudo piloto com amostras de dentina radicular, conformando-se dois grupos de 5 amostras cada, as quais foram submetidas a duas taxas de dose diferentes no Irradiador Co^{60} com uma taxa de dose do equipamento (Outubro 2015) de 956 Gy/h e uma dose de trânsito (Outubro 2015) de 0,81 Gy:

1.-) O primeiro grupo foi submetido a uma taxa de dose de 10 Gy /2,2 segundos, como dose única. Em seguida, realizou-se a irrigação do campo com a solução de Timol e água destilada, e foi armazenada sob refrigeração 4 °C;

2.-) O segundo grupo foi submetido a uma taxa de dose fracionada de 2 Gy/ 4,4 segundos durante 5 dias consecutivos até completar uma dose total de 10 Gy. Após cada irradiação as amostras foram irrigadas com a solução descrita anteriormente e armazenadas sob refrigeração de 4 °C.

Ambos os grupos foram submetidos a análise de MDS após irradiação. Realizou-se o cálculo de média e o desvio padrão das 15 endentações realizadas, e posteriormente calculou-se a porcentagem de perda mineral de cada amostra. Segundo os resultados obtidos nos gráficos de dispersão e a plotagem, o estudo piloto indicou uma grande variação dos resultados iniciais e finais de MDS com a taxa de dose 10 Gy, conforme a desvio padrão obtido, pelo qual se resolveu usar a taxa de dose fracionada de 2 Gy/4,4 segundos para todos os grupos em estudo.

1.4.2 Irradiação das amostras de esmalte dentário

As amostras de esmalte dentário foram colocadas em Placas de Petri submersas em algodão umidificado com a solução de Timol e água destilada como descrito anteriormente no estudo piloto. Estas foram distribuídas em 5 amostras por cada placa de Petri.

Em seguida, deu-se início ao protocolo de irradiação no Irradiador de Cobalto-60 (*Fonte GammaCell* , Co⁶⁰) com uma taxa de dose do equipamento para o mês de março de 2016 de 903 Gy/h, uma dose de transito de 0,76 Gy e , finalmente, uma taxa de dose de 2 Gy/ 4,94 segundos. Foi realizada a irradiação duas vezes por dia (4 Gy por dia) com um intervalo de 8 horas para cada irradiação, durante 5 dias até completar uma dose semanal de 20 Gy. Após a segunda irradiação do dia, as amostras foram submetidas à irrigação com a solução de Timo e água destilada e posteriormente foram armazenadas sob refrigeração 4 °C.

1. 4.3 Irradiação das amostras de dentina radicular

As amostras de dentina radicular foram submersas em algodão, umidificado com a solução de Timol e água destilada e colocadas nas placas de Petri. Estas foram submetidas à irradiação gama no Irradiador de Cobalto-60 (*Fonte Gammacell*, Co⁶⁰) com as características anteriormente descritas. As amostras receberam uma taxa de dose fracionada de 2 Gy / 4,94 s duas vezes nos dia, completando semanalmente uma dose de 20 Gy . A dose total de irradiação foi de 72 Gy. Foi realizada a reidratação das amostras após o segundo tempo de irradiação no dia.

1. 4.4 - Irradiação das amostras da região do trígono retro molar

Para o caso das amostras de trígono retro molar foi realizado o procedimento previamente descrito para a dentina radicular e o esmalte dentário. Estas foram acondicionadas nas placas de Petri umidificadas com a solução de Timol e de água destilada para manter um ambiente úmido e livre de crescimento de fungos. Os blocos foram submetidos à irradiação diária com uma taxa de dose de

2 Gy / 4,94 s duas vezes no dia até completar uma dose semanal de 20 Gy. Após o segundo tempo de irradiação, a qual foi realizada em um intervalo de aproximadamente 8 horas realizou-se a reidratação das amostras e estas finalmente foram armazenadas sob refrigeração de 4 °C para as próximas irradiações.

1. 4.5 - Irradiação das amostras de corpo mandibular

O grupo de amostras de corpo mandibular suíno foi colocado em placas de Petri distribuídas em subgrupos de 5 amostras por cada placa, as quais foram submersas em algodão umidificado para manutenção do ambiente úmido e inibição de crescimento fúngico. Estas foram submetidas à irradiação gama na Fonte Cobalto-60 (*Gammacell*, Co60) com uma taxa de dose fracionada de 2 Gy/4,94 s duas vezes por dia, até completar uma dose semanal de 20 Gy, e uma dose total de 72 Gy. Após o segundo tempo de irradiação, as placas de Petri foram reidratadas e armazenadas sob refrigeração de 4 °C.



Fig. 5. Fonte de irradiador de Cobalto-60 Gammacell. Taxa de dose: 2 Gy / 4,4 segundos, recebida duas vezes por dia (DOSE TOTAL = 72 Gy)



Fig. 6. Posicionamento das placas de Petri com as amostras de corpo mandibular antes de elas serem submetidas à irradiação gama

1. 5 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Duas amostras de cada grupo foram submetidas à análise por MEV. As amostras foram transferidas para tubos *ependorf* e imersas à desidratação progressiva com soluções de concentrações crescentes de álcool (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 96% e 100%), onde foram submersas por 15 minutos em cada solução. Após a desidratação progressiva, as amostras foram secas em dessecador por, no mínimo, 24 horas antes de serem submetidas ao início da metalização. Até o momento da obtenção das imagens, as amostras foram mantidas em dessecador com sílica para evitar alteração da superfície preparada. Os grupos foram codificados por cores para evitar identificação nas análises, mantendo o delineamento cego de estudo. Foi utilizado o microscópio TM 3000 *Tabletop Microscope* (Hitachi) do Centro de Lasers e Aplicações – IPEN/CNEN- SP, com tensão de 5 kV. As amostras serão analisadas de maneira que os Grupos previamente codificados serão intercalados sucessivamente para “padronização” de possíveis alterações dos equipamentos de MEV ou viés do operador, conforme protocolo de randomização de análise. Para cada amostra analisada foram obtidas, no mínimo, quatro imagens em diferentes aumentos pré-determinados: a primeira imagem foi realizada com a magnificação de 50 X para verificação da superfície da amostra, seguida por imagens de 700 X, 2000 X e 4000 X de aumento ou mais.

1. 6 – Análise de % de perda de dureza de superfície

Realizou-se matematicamente o cálculo de percentagem de perda de dureza de superfície dos quatro grupos amostrais, aplicando-se uma fórmula previamente estabelecida, a qual visa determinar aproximadamente a quantidade de perda mineral das superfícies atingida pela irradiação gama.

$$\% \text{ Variação de Dureza de Superfície} = \frac{\text{MDS Inicial} - \text{MDS Pós-tratamento} \times 100}{\text{MDS Inicial}}$$

1.7 Análise morfológica através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Quatro amostras por cada grupo foram selecionadas para serem avaliadas morfolologicamente através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Em um primeiro momento as amostras foram tratadas e preparadas (condicionamento inicial) fisicamente para posterior análise no MEV. Escolheram-se diferentes concentrações de etanol com a finalidade de desidratar-se cada amostra incluída em uma escala decrescente: 10%, 30%, 50%, 70 %, 90%, 96% e 100% por 15 minutos em cada solução. As amostras foram examinadas no Microscópio Eletrônico de Varredura TM 3000 *Tabletop Microscope* (Hitachi, Japan) do Centro de Tecnologia dos Materiais no IPEN/ CNEN- São Paulo, Brasil, com uma tensão de 15 Kv e Analy (EDS) para obtenção de maior resolução da imagem com uma ampla especificidade da superfície a ser analisada. Para facilitar a fixação da amostra na porta amostras do MEV empregou-se uma fita dupla adesiva de carbono, condutora. Cada grupo foi submetido à desidratação com álcool anteriormente descrita e em seguida, foram colocados no dissecador de sílica por um período mínimo de 24 horas com a finalidade de obter-se uma superfície plausível para análise no MEV. Para cada amostra analisada formas obtidas, no mínimo, quatro imagens em diferentes aumentos pré-determinados: a primeira análise foi desenvolvida com uma magnificação de 50 X para análise da superfície geral das amostras, posteriormente, as magnificações foram aumentando de 5000 X, 1000 X, 2000 X, 4000 X. Foram observados os aspectos estruturais e morfológicos de cada tecido duro decorrentes da irradiação gama, tanto os efeitos na superfície no geral quanto as avaliações de regiões específicas; além da análise do grupo controle (sem irradiação) com a finalidade de avaliar a homogeneidade e características iniciais do padrão normal dos tecidos biológicos. As análises das imagens obtidas foram avaliadas num software específico.

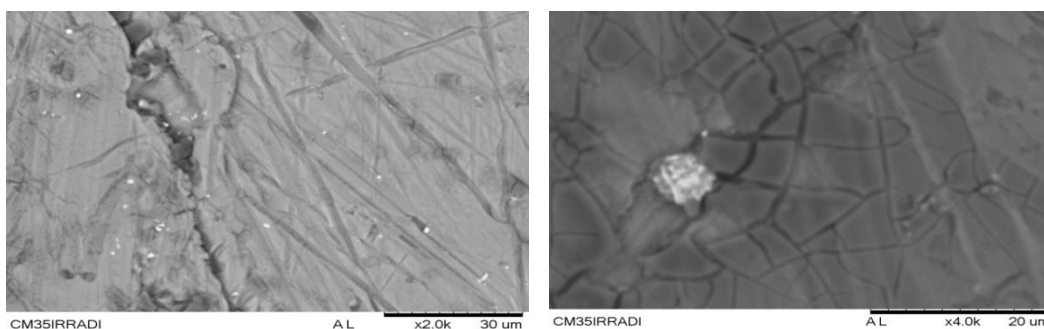


Fig. 4. 6. 10 Imagens de corpo mandibular mostra os efeitos deletérios causados pela irradiação gama na superfície do tecido duro. Apresenta-se os trincamentos, perfurações e linhas de fraturas das amostras submetidas à irradiação, distinguindo-se os diferentes graus de acometimento em cada aumento apresentado, observando-se deslocamentos dos fragmentos, quanto a perda de continuidade do tecido no que diz à uma superfície lisa, plana e sem áreas esburacadas ou perfuradas. Na última imagem, na qual apresenta-se uma fragmentação progressiva entorno de um núcleo central, com separação das formas, com aspecto de uma fratura cominutiva da superfície da amostra de corpo mandibular. Além disso, é peculiaridade desta amostra mostrar diferentes tipos de trincamentos com profundidade reduzida e uma tênue linha de fratura central



Fig 4. 6. 6 Imagem da amostra da região do trigono retromolar antes da irradiação gama, após polimento mecânico, na qual pode observar-se uma superfície lisa e uniforme, correspondente a um tecido aparentemente saudável no nível macrorregional, analisada com um aumento de 500 X. A porosidade observada neste caso refere-se ao trabeculado e aos condutos haversianos presentes.

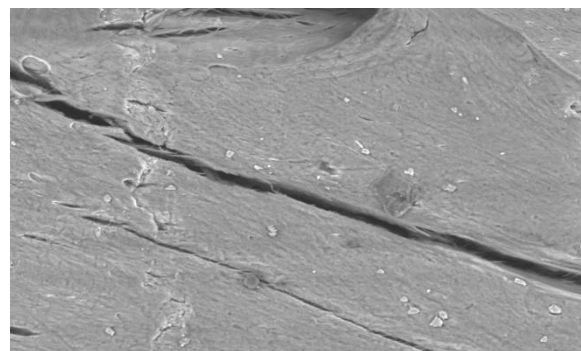
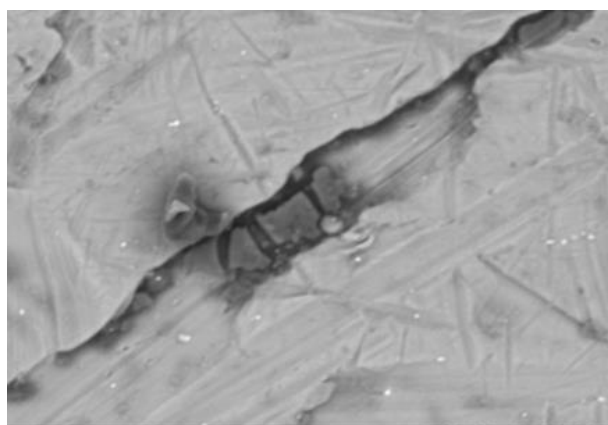
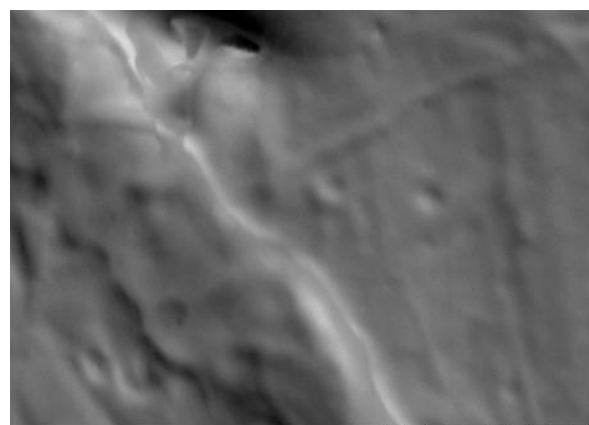


Fig. 4. 6. 7 Imagem da amostra da região do trigono retromolar após a dose total recebida de radiação gama (72 Gy). A imagem mostra uma acentuada desorganização da superfície analisada, apresentando um trincamento de comprimento considerável, além de observar-se trincas menores ao redor da trinca maior, pelo qual considera-se que o efeito da radiação no local irradiado exerceu um maior efeito deletério em um determinado local quando comparado com outros locais da superfície. Por outro lado, a instabilidade gerada pela radiação gama conduz a uma destruição maior do tecido, conjuntamente com a perda da dureza da superfície.

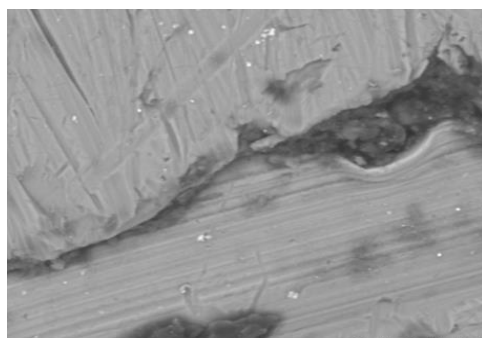


E20EEIRRAD A L x2.0k 30 um

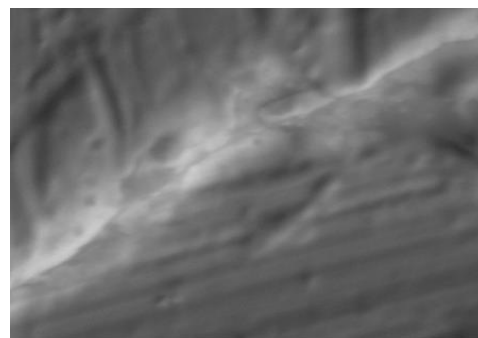


E20EEIRRAD A L T x4.0k 20 um

Fig. 4. 6. 8 Imagem de amostra de esmalte dentário após a irradiação gama mostrada a diferentes aumentos nas quais observa-se uma clara desintegração e deterioro da superfície do esmalte, com presença de trincamentos e linhas de fratura ao redor da superfície central. A amostra foi submetida à irradiação gama com uma dose total de 72 Gy. Posteriormente a um maior aumento (2000 x) consegue-se distinguir um trincamento de maior comprimento ao nível da superfície, de forma irregular e esburacada, pelo fato da radiação gama ter alterado a integridade estrutural, inclusive observando-se fragmentos do tecido duro acometido. Finalmente, na imagem D, uma acentuada linha de fratura é observada na superfície, de comprimento considerável, destacada num maior aumento (4000 x).



D03EEIRRAD A L x2.0k 30 um



D03EEIRRAD A L T x4.0k 20 um

Fig. 4. 6. 9 Imagens da amostra de dentina radicular após a irradiação gama. No que diz respeito à imagem C, com um aumento de 2000 x e em outro ponto da superfície da amostra de dentina destaca-se outra linha de fratura, com deslocamento leve das bordas e perda da continuidade do tecido mineralizado, o qual novamente representa o acometimento em outro ângulo da superfície do bloco de dentina analisado, obtendo-se maiores detalhes por uso de um aumento da lente do microscópio maior. Finalmente, na última figura observa-se ao longo do eixo principal da amostra um trincamento que estende-se na maior parte da superfície da amostra, visualizando-se no modo de imagem topográfico e detectando-se claramente o efeito deletério causado no bloco irradiado, com uma lente de aumento 4000x.

1.8 Análise por Espectroscopia ATR - FTIR

As amostras irradiadas e não irradiadas foram analisadas por Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier, no equipamento Espectrômetro infravermelho FTIR (*Perkin - Elmer*, 100) do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN/CNEN, São Paulo, Brasil, cujos espectros foram obtidos por reflexão total atenuada (ATR), numa faixa de frequência de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} , e uma precisão de aquisição de 4 cm^{-1} . Optou-se por uma maior quantidade de varreduras seguindo os últimos reportes da literatura (Zezell) para obtenção de espectros de tecido duro da cavidade bucal, completando-se um total de 80 varreduras com subtração do background (BG). O cristal que compunha o equipamento para a análise foi o seleneto de zinco (ZnSe), para se obter uma análise bioquímica, qualitativa e semi-quantitativa do conteúdo orgânico e inorgânico presente nelas. As amostras foram descoladas das lâminas de acrílico e foram posicionadas acima do cristal de ZnSe para obtenção dos espectros gerados pela transformada de Fourier. Logo depois das amostras serem descoladas e posicionadas centralmente no cristal, seguiu-se o ajustamento contra o cristal usando uma determinada força de torque de 130 N, o qual permitiu uma análise exata e acurada das amostras.



Fig. 4. 7. 1 Espectrofotômetro de ATR-FTIR para análise por reflexão total atenuada das amostras.

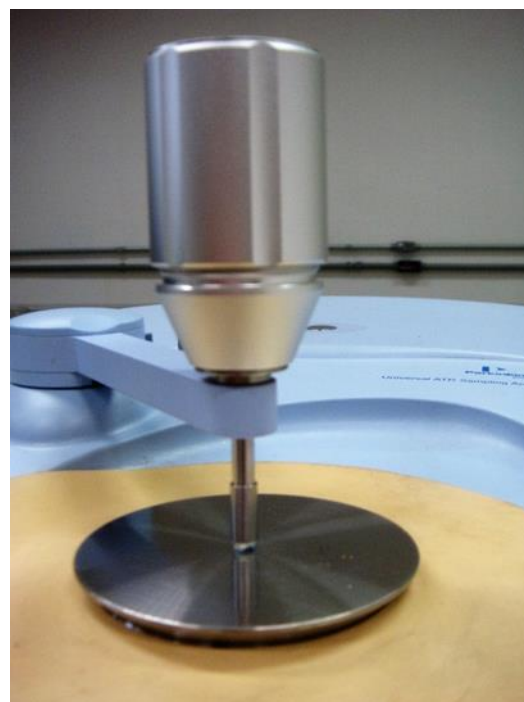


Fig. 4. 7. 8 Análise por reflexão total atenuada das amostras em estudo, com a aplicação de uma força de pressão de 130 N

2. Resultados e Discussão

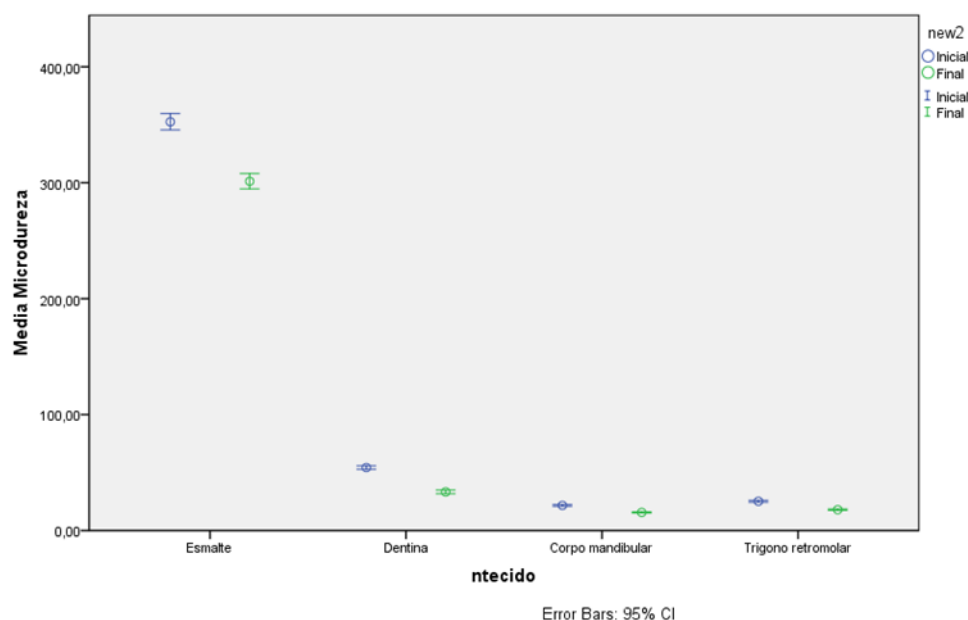


Gráfico 1.1: Esquema representativo da prova de t de student para análise dos valores da média e desvio padrão dos valores de microdureza inicial e final das amostras em estudo

Após as avaliações da Microdureza de Superfície dos tecidos antes e depois de serem submetidos à irradiação gama simulando um modelo *in vitro* de um paciente acometido por câncer de cabeça e pescoço, os resultados preliminares mostram, em linhas gerais, uma ampla diminuição da dureza da dentina radicular e do osso mandibular principalmente, em concordância com estudos prévios, e no caso do esmalte dentário, o qual apresentou uma leve diminuição dos valores iniciais de dureza, e em alguns casos, apresentou um aumento da mesma como valores mais altos do que os iniciais, correspondente aos resultados obtidos por outros estudos^{14,16,17,18}. Os resultados foram agrupados e realizaram-se testes de normalidade, homogeneidade e independência dos mesmos para estabelecer posteriormente os modelos estatísticos a serem usados, neste caso, empregou-se o teste t de *student* das médias relacionadas para cada grupo do estudo, obtendo-se finalmente um valor de $p = 0,00$, pelo qual se descartou a hipótese de nulidade, desmontando-se que a radiação ionizante apresenta um efeito significativo nos tecidos duros da cavidade bucal, especificamente, um efeito deletério no que diz respeito à microdureza de superfície.

No entanto, no caso do grupo da dentina radicular observou-se uma leve superioridade dos resultados obtidos quando comparados com os outros tecidos de maior conteúdo orgânico, tais como o corpo mandibular e o trígono retromolar, sendo o resultado do desvio padrão inferior quando comparado com o esmalte dentário. Finalmente, o grupo de corpo mandibular e a região do trígono

Fig. 4. 7. 1 Espectrofotômetro de ATR-FTIR para análise por reflexão total atenuada das amostras.

retromolar apresentaram resultados muito próximo ao respeito da variabilidade de resultados entre a diferença dos valores iniciais de microdureza de superfície, pelo qual posteriormente observar-se-á que não houve diferenças estatisticamente significativas, considerando-se os resultados como um efeito similar exercido pela radiação gama em ambos os tecidos. Finalmente, o grupo de corpo mandibular e a região do triângulo retromolar apresentaram resultados muito próximo ao respeito da variabilidade de resultados entre a diferença dos valores iniciais de microdureza de superfície, pelo qual posteriormente observar-se-á que não houve diferenças estatisticamente significativas, considerando-se os resultados como um efeito similar exercido pela radiação gama em ambos os tecidos.

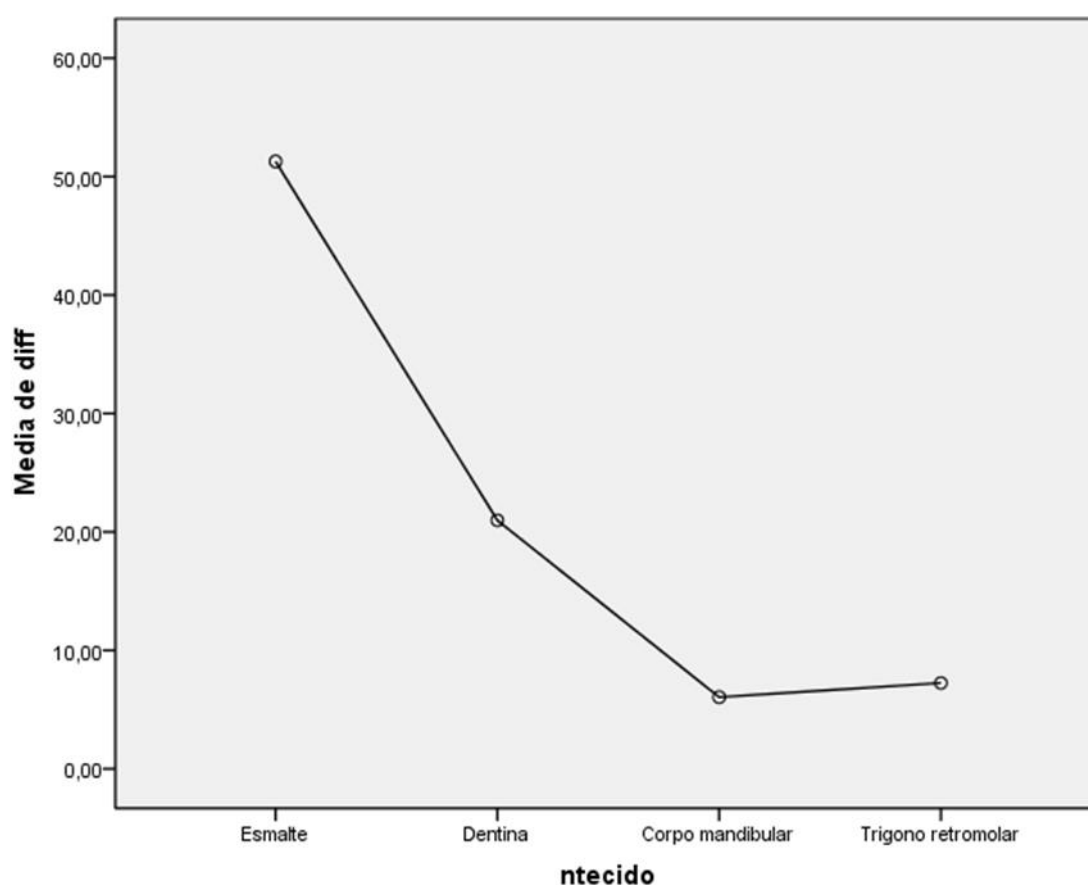


Gráfico 1.2 Média das diferenças dos valores de microdureza de superfície e inicial dos grupos em estudo

No caso do gráfico 5.5 o esmalte apresentou um maior valor da média da diferença dos valores de microdureza de superfície inicial e final, ou que provavelmente demonstra um maior acometimento da superfície de esmalte pela radiação gama, obtendo-se valores muito inferiores de microdureza final quando comparados com os valores iniciais de dureza da superfície. Ao respeito da dentina, obteve-se um valor da média menor quando comparado com o esmalte e superior quando comparado com as regiões de osso mandibular. Segundo a literatura recente, a dentina foi o tecido duro de maior acometimento e grau de destruição pela radiação gama, considerando-se a sua composição orgânica e inorgânica e um maior conteúdo de água com respeito ao esmalte dentário, além das proteinases e metalo-proteinases ativadas durante o processo destrutivo e de desnaturalização proteica. No

presente estudo a dentina radicular apresentou uma menor taxa de acometimento quando comparado com o esmalte, embora alguns estudos apresentaram resultados similares com este estudo, porém com um determinado limiar de dose empregada (doses até de 30 Gy se apresentou uma perda de dureza maior do que em doses superiores). O resultado apresentado neste estudo ao respeito do esmalte dentário implicaria uma maior revisão e posteriores estudos a serem realizados do efeito direto da radiação gama, seja a modalidade de aplicação, sobre o esmalte dentário humano e a consequente perda de dureza do tecido, com uma consequente desorganização físico-química e posteriormente um rápido avanço nos tecidos subjacentes. A cárie de radiação caracteriza-se pela rápido avanço e destruição que ela produz nos dentes dos pacientes submetidos à radioterapia, e o fato de requer de um tratamento de alta complexidade e de difícil manejo e as sequelas físicas e psicológicas nestes pacientes, possivelmente seja justificado pelo fato da radioterapia exercer um efeito deletério no esmalte dentário, como demonstrado neste estudo.

Conclusões

A partir dos resultados preliminares pôde-se estabelecer uma conclusão inicial do presente estudo, salientando-se o efeito direto da radiação ionizante, no caso, a irradiação como fator determinante e contribuinte à perda das propriedades mecânicas e morfológicas dos tecidos duros submetidos à radioterapia convencional, a partir de um modelo *in vitro*, dos pacientes acometidos por câncer de cabeça e pescoço, o que favorece de fato o aparecimento dos efeitos indesejáveis desta modalidade terapêutica, independente dos fatores contribuintes locais ou sistêmicos.

Referências Bibliográficas

1. ESTIMATIVA 2016, INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. 2015. Disponível eletronicamente no site: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf>
2. ESTIMATIVA 2014, INCIDENCIA DE CÂNCER NO BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. 2014. Disponível eletronicamente no site: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf
3. CARINI, F., BUCALO, C., SAGGESE, V. Case control study to assess the possibility of decrease the risk of osteoradionecrosis in relation to the dose of radiation absorbed by the jaw. *Annali di Stomatologia.*, v. 3:3-7, 2012
4. GRIMALDI, N.; SARMENTO, L; PROVEDEL, L. Dental care in prevention and treatment of osteoradionecrosis: literature review. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Vol. 51: 319-54, 2005.
5. ZAMATARO CB, ANA PA, BENETTI C, ZECELL DM. Influence of Er,Cr:YSGG laser on CaF₂-like products formation because of professional acidulated fluoride or to domestic dentifrice application. *Microsc Res Tech.* Vol76(7):704-13, 2013.
6. McGUIRE, JD; MOUSA, AA; ZHANG, BJ; TODOKI, LS. Extracts of irradiated mature tooth crowns contains MMP-20 protein and activity. *J Dent* 42(5): 626-35, 2014.
7. KADAM SB., SHYAMA SK., ALMEIDA VG. Evaluation of the *in vivo* genotoxic effects of gamma radiation on the peripheral blood leukocytes of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Mutat Res.* 2013 Apr 15;752(1-2):42-6. doi: 10.1016

8. MELBERG, J.R. Hard Tissue Substrates for Evaluation of Cariogenic and Anicariogenic Activity In Situ. *Acta Odontol Scand.*, v. 57(6), p. 334-41, 1999.
9. ARBABZADEH F., et al. A Comparative study on microhardness and structural changes of dentin floor cavity prepared by Er: YAG Laser irradiation and mechanical Bur. *J Dent (Shiraz)*.
10. KOULOURIDES T. Dynamics of tooth surface-oral fluid equilibrium. *Adv Oral Biol.* Vol. 2:149-71, 1966.
11. KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. Curso Introdução de Microscopia Eletrônica de Varredura, 2ª Edição. NAP/MEPA, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
12. TERUEL J., ALCOLEA A., HERNÁNDEZ A., ET AL. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*. 60: 768-775, 2015.
13. KUNIN A. A. , EVDOKIMOVA Y. A. , MOISEEVA S.N. Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries. *The EPMA Journal*. 6(3): 1-11, 2015.
14. REED, R., XU C., LIU Y., et al. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. *Archives of Oral Biology*. 60: 690-697, 2015.
15. ARSECULARATNE J. A., HOFFMAN M. An in vitro study of the microstructure, composition and nanoindentation mechanical properties of remineralizing human dental enamel. *Journal of Physics D. Appl. Phys.* 47º Edição: 1-13, 2014.
16. NAPOLITANO G. L., GUENKA P. R., GARCIA P. F., et al. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. *Journal of Dentistry*. 42: 986-992, 2014.
17. LIESHOUT H.F.J., BOTS C.P. The effect of radiotherapy on dental hard tissue – a systematic review. *Clinical Oral Investigations*. 18:17-24, 2014
18. PING Q., HUANG S., SHANSHAN G., et al. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth enamel. *Nature, Scientific Reports*. 2015
19. DENG J., JACKSON L., EPSTEIN J. B., et al. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. *Oral Oncology*. 51:824-839, 2015
20. VISSINK A., et al. Oral Sequelae of Head and Neck Radiotherapy. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14(3):199-212, 2003.
21. FARAMAWY-EI N., AMEEN R., HADDAD-EI K., et al. Effects of gamma radiation on hard dental tissues of albino rats: investigation by light microscopy. *Radiation Environment Biophysics*. 52: 375-387, 2013.
22. TRENTO C.L. Densitometria óssea em mandíbula de suínos submetidos a enxerto ósseo autógeno, homogêneo e heterogêneo. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2006.
23. TYMCZYNA B., TATARA M.R., KRUPSKI W., et al. Relationships between biochemical bone metabolism indices and morphometric, densitometric and mechanical properties of mandible in 6-months-old pigs. *Annals of Agricultural and Environment Medicine*. 19(3) : 535-539, 2012
24. LI Y., XU J., MAO L., et al. Allogenic Mesenchymal Stem Cell Therapy for bisphosphonate-related jaw osteonecrosis of swine. *Stem cells and Development*. 22(14): 2047-2056, 2013
25. BROSH T., ROZITSKY D., GERON S., et al. Tensile Mechanical Properties of Swine Cortical Mandibular Bone. *PLOS ONE*. 2014
26. LIN H-S., CHEN Y-J., LI J-D., et al. Measurement of Mandibular Growth Using Cone- Beam Computed Tomography: A Miniature Pig Model Study. *PLOS ONE*. 9(5): 1-10, 2014
27. PEARCE AI., RICHARD RG., MILZ S., et al. Animal Models for implant biomaterial research bone: A review. 13: 1-10, 2007.
28. HADLEY T., SONG C., WELLS L., et al. Does hyperbaric oxygen therapy have the potential to improve salivary gland function in irradiated head and neck cancer patients?. *Medical Gas Research*. 3(15):1-5, 2013

29. GEVORGYAN A., WONG K., POON I., et al. Osteoradionecrosis of the mandible: a case series at a single institution. *Journal of Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 42(46):1-7, 2013
30. NIEWALD M., FLECKENSTEIN J., MANG K., et al. Dental status, dental rehabilitation procedures, demographic and oncological data as potential risk factors for infected osteoradionecrosis of the lower jaw after radiotherapy for oral neoplasms: a retrospective evaluation. *Radiation Oncology*. 8:227, 2013
31. REUTHER T., SCHUSTER T., MENDE U., et al. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumor patients-a report of a thirty year retrospective review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.32:289-295, 2003