



6, 7, 8 octubre 2016

## **Estudio *in vitro* de la composición y la microdureza de los tejidos duros de la cavidad bucal sometidos a la irradiación gamma con la dosis usada en el tratamiento de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello**

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

(1) Mestrando em Ciências del *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN*, San Pablo, Brasil

(2) Doctoranda em Estatística del *Instituto de Matemática e Estatística IME/* San Pablo, Brasil.

(3) Investigadora Titular del *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN*.

(4) Investigador Titular del *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN*.

E-mail: ebernaola@usp.br

### **Resumen**

**Introducción.** La radioterapia clínica es de fundamental importancia para el tratamiento de las lesiones malignas ubicadas en la región de cabeza y cuello, sin embargo, la exposición crónica a la radiación ionizante podrá traer complicaciones sistémicas y locales durante y después del tratamiento radioterápico. Dentro de las complicaciones locales inmediatas, destacase en la cavidad bucal la xerostomía y la consecuente mucositis oral. Con respecto a las complicaciones tardías producidas por la técnica, sobresalen la caries de radiación y la osteorradionecrosis, lesiones dosis dependiente, presentando esta última un alto nivel de incidencia en las últimas décadas (1-30%), y de difícil manejo, aunque estas se manifiesten al finalizar el tratamiento y por contribución de factores locales. **Metodología.** La metodología propuesta en el presenta pretende analizar el efecto directo de la radiación gama tras la irradiación de muestras de esmalte dentario, dentina radicular y hueso alveolar, usando la dosis utilizada en el tratamiento de pacientes afectados por cáncer de cabeza y cuello. Las muestras fueron padronizadas y preparadas además de recibir un minucioso pulimento y fueron sometidas al análisis de microdureza de superficie inicial. Posteriormente, las muestras fueron irradiadas con una tasa de dosis de 2 Gy por día hasta completar una dosis total de 72 Gy. Finalmente las muestras fueron analizadas morfológicamente a través del microscopio electrónico de barradura y un análisis final de la microdureza de superficie. **Resultados y discusión.** Los resultados obtenidos de microdureza de superficie fueron evaluados por análisis estadística a través de la prueba paramétrica t de *student* para promedios relacionados, obteniéndose un resultado estadísticamente significativo ( $p=0,00$ ) para los cuatro grupos. **Conclusión.** A partir de los resultados preliminares estadísticos, concluyese que el efecto directo de la radiación gama fue significativo de forma perjudicial con la consecuente disminución de la dureza de los tejidos duros afectados, comprobándose morfológicamente a través del análisis por la microscopía.

Palabras clave: osteorradionecrosis, microdureza, esmalte dental

### **1. INTRODUCCIÓN**

La estimación del cáncer en Brasil, para el bienio 2016-2017, señala la ocurrencia de 600 000 nuevos casos de cáncer. A excepción de cáncer de piel no melanoma (aproximadamente 180.000 nuevos casos), habrá alrededor de 420.000 nuevos casos de cáncer. El perfil epidemiológico observado se asemeja a la América Latina y el Caribe, donde el cáncer de próstata (61.000) en los hombres y el cáncer de mama (58.000) en las mujeres son las más frecuentes. Por no hablar de los casos de cáncer de piel no melanoma, los tipos más frecuentes en los hombres son de próstata (28,6%), pulmón (8,1%), colon (7,8%), estómago (6,0%) y cavidad oral (5,2%). En las mujeres, los cánceres de mama (28,1%), el intestino (8,6%), el cuello uterino (7,0%), pulmón (5,3%) y estómago (3,7%) estarán entre los principais<sup>1</sup>.



6, 7, 8 octubre 2016

El cáncer se constituyó y constituye actualmente en un problema de salud pública, por lo que su control y la prevención debe ser una prioridad en el país. Los cánceres se desarrollan en múltiples etapas a lo largo de los años, por lo tanto, algunos tipos pueden prevenirse mediante la eliminación a la exposición de los factores contribuyentes. Si el potencial de malignidad se detecta antes de que las células se vuelven malignas, en una etapa temprana de la enfermedad, el tratamiento puede ser muy eficaz y con una alta probabilidad de cura<sup>2</sup>. Entre los tratamientos usados comúnmente para tratar el cáncer es la radioterapia, ampliamente utilizado como un tratamiento definitivo o adyuvante de la cirugía, especialmente en los cánceres de la cabeza y cuello<sup>3</sup>. Sin embargo, altas dosis de radiación en áreas de grandes dimensiones, tales como la cavidad oral, maxilar superior, mandíbula y de las glándulas salivales pueden dar lugar a efectos indeseables, de aparición inmediata o tardía, que la osteorradionecrosis (ORN) se considera probablemente el peor<sup>4</sup>.

La ORN es uno de las más graves complicaciones orales de la radioterapia del cáncer de cabeza y cuello. Algunos autores afirman que a pesar de la mejora en la atención dental realizada antes de la radioterapia, la incidencia de la ORN no disminuyó significativamente en los últimos años, por el contrario, aumentó en un 1% a un 30%<sup>3</sup>.

La ORN se define como el hueso necrótico expuesto anteriormente, que no se cura en un período de tres meses más tiempo sin la presencia de tumor remanente o recurrencia del tumor. Esta entidad patológica se puede encontrar tanto en la zona de la mandíbula superior, como en la región mandibular con una alta tasa de incidencia en la región de cuerpo mandibular y la región retromolar documentado en los últimos años,<sup>4-7</sup>. Los síntomas clásicos de la ORN consisten en un dolor insoportable, fractura patológica del hueso afectado, sequestrados óseos desvitalizados, procesos fistulosos, que produce la incapacidad de los pacientes para alimentar normalmente. La causa de la aparición de la ORN en un tiempo inferior a dos años después de la radioterapia se debe a altas dosis de radiación de más de 70 Gy en pacientes que reciben afectadas por cáncer de cabeza y cuello, y al mismo tiempo realizar un procedimiento quirúrgico después del tratamiento con radiación ionizante. La radioterapia reduce la proliferación de las células en médula ósea, tejido periosteal y las células endoteliales y la producción de componentes de la matriz extracelular orgánica tal como el colágeno<sup>8</sup>.

La patogénesis de la ORN sigue permaneciendo si se esclarece. Numerosas teorías se basan en los postulados de Marx<sup>3</sup>, que dice que esta enfermedad debe ser considerada como una lesión en el hueso que no se cura para los problemas metabólicos y trastornos homeostáticos. Otros autores<sup>3, 4</sup> consideran que el resultado de la ORN es por el hecho del hueso tornarse hipóxico, hipovascular e hipocelular por el deterioro de los vasos sanguíneos, un proceso conocido como endarteritis, y por lo tanto obtiene un tejido desorganizado y friable que no se cicatriza. Actualmente, se apunta a una nueva hipótesis sobre la patogénesis de la ORN, proponiendo un mecanismo de atrofia ósea fibrosa inducida por radiación ionizante, incluyendo la formación de radicales libres, la disfunción endotelial, la inflamación, la trombosis microvascular, fibrosis y remodelación. Como resultado, la progresión de la ORN se debe a la activación y regulación de la actividad no fibroblástica que torna el tejido atrofiado dentro del área previamente irradiada.

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de la ORN, uno de los principales considerados por los autores<sup>3, 4</sup> es la radiación ionizante, cuyos modos diferentes incluyen: la dosis total, la cantidad de energía por fotón, la braquiterapia, el campo de radiación y el fraccionamiento de la dosis. Sin embargo, se ha desarrollado nuevas formas de radioterapia, como la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) en la que pequeños volúmenes de la mandíbula superior y la mandíbula reciben altas dosis de radiación, sin embargo, también se han dado casos de ORN en pacientes sometidos a estas modalidades terapéuticas para las que hay una necesidad de más estudios para aclarar la patogénesis de la ORN, en concreto, la acción directa de la radiación ionizante en los tejidos duros de la cavidad oral, y posteriormente establecer modalidades futuras en el tratamiento y prevención de efecto nocivo de radioterapia<sup>4</sup>.



6, 7, 8 octubre 2016

De acuerdo con un estudio<sup>3</sup>, es improbable que la ORN aparezca cuando la dosis de radiación gama usada fuera menor de 70 Gy; sin embargo, otro estudio<sup>4</sup> se refirió a un aumento en la incidencia de la ORN en los pacientes que recibieron dosis entre 65 a 70 Gy, teniendo como dosis media 66 Gy.

Dada la alta incidencia (1-30%)<sup>3, 4</sup> de las lesiones de osteorradionecrosis que afectan a los pacientes sometidos a radioterapia para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, se cree que este estudio puede añadir datos aún inéditos en la literatura a partir de un modelo *in vitro* sobre la acción directa de la radiación ionizante en los tejidos duros de la cavidad bucal. La osteorradionecrosis es una complicación que reduce la supervivencia de los pacientes irradiados ya que puede causar procesos infecciosos, locales y sistémicos, que aumenta la morbilidad, y puede disminuir considerablemente la calidad de vida del paciente irradiado. Además, la osteorradionecrosis puede requerir cirugía mutilante. En vista de lo anterior, se propone este estudio para contribuir en el entendimiento del mecanismo para el desarrollo de este efecto de la radiación ionizante, la participación de todos los tejidos duros de la cavidad oral, con el fin de determinar *in vitro*, evaluando la acción directa de radiación gamma, como un factor de riesgo aislado para el desarrollo de efectos secundarios de la misma radioterapia, lo que podría beneficiar a futuro, después de más estudios específicos, el control de estas complicaciones de la radioterapia en pacientes que sufren de cáncer de cabeza y cuello.

Aunque un estudio reciente<sup>5</sup> en el Laboratorio Biofotónica en el Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares - IPEN (San Pablo - Brasil) mostró que, de forma aislada, el esmalte sometido a la irradiación ionizante puede no ser más susceptible a la desmineralización cuando comparado con el grupo de esmalte no irradiado, lo que fue observado *in vitro*. En el caso de la dentina radicular, la cual presenta un contenido de materia orgánica mayor que el esmalte; se ve más afectada por la radiación gamma en comparación con la dentina coronal, que tiene un contenido mineral superior, como se muestra en literatura,<sup>6-8</sup>. En los pacientes irradiados es extremadamente importante que existe una adaptación del medio bucal antes de la radioterapia, para mantener las condiciones de higiene y alimentación de forma apropiada durante y después del protocolo ejecutado de radioterapia. Sin embargo, la dificultad en la limpieza de la cavidad bucal que se produce en los pacientes sometidos a radioterapia, se debe principalmente por la incidencia de mucositis, rigidez muscular y trismos de aparición aguda; y en el caso de tejido alveolar, la presencia de osteorradionecrosis como efecto perjudicial dependiente, asociada a la dosis administrada, y que puede ocurrir durante y después del tratamiento radioterápico,<sup>3,4</sup>.

Aunque algunos estudios,<sup>9-21</sup> mostraron resultados desfavorables en los tejidos duros de la cavidad bucal con alto contenido orgánico después de la radioterapia; sin embargo, se hace necesario analizar la cantidad de tejido mineral perdido que se produce en los tejidos duros sometidos a radiación gamma.

Considerando que se torna esencial, se investigue estrategias de prevención que actúen de una forma más extensa en los tejidos irradiados y que estos estudios son inviables de ser realizados en los pacientes sometidos a radioterapia *in vivo*, desde el punto de vista ético, surge la necesidad de desarrollar un protocolo *in vitro* para el análisis directo de las propiedades físicas, químicas y de contenido mineral afectadas de los tejidos duros por la radioterapia,<sup>14, 23-27</sup>.

La determinación de los efectos causados por la radiación ionizante, con la dosis utilizada en pacientes afectados con cáncer de cabeza y cuello, a partir de un modelo *in vitro*, en términos de los cambios en la composición y microdureza de superficie, hará que en el futuro las posibles complicaciones inherentes a la radiación se reduzcan o sean erradicadas por un manejo adecuado de la dosis y del campo irradiado, así como por la elaboración de procedimientos preventivos, a partir de datos obtenidos *in vitro*,<sup>22-31</sup>.



6, 7, 8 octubre 2016

Por tanto, este estudio tiene por objetivo determinar, por medio de un análisis cualitativo y cuantitativo, el efecto directo e aislado de la radiación gamma sobre los tejidos duros de la cavidad bucal mediante análisis morfológico en la microscopía electrónica de barrido y microdureza de superficie.

## 2. 2. METODOLOGIA

En este estudio fueron utilizados terceros molares humanos y mandíbula suína sobre la aprobación del comité de ética en humanos de la facultad de odontología de la Universidad de San Pablo, USP, 43/2008 Protocolo y el comité de ética en el uso de animales, CEUA, del Instituto de investigación de energía y nucleares, parecer - Proyecto N° 144/14-CEUA-IPEN / SP.

### 2. 1. OBTENCIÓN Y PREPARO DE LAS MUESTRAS DE ESMALTE Y DENTINA HUMANOS

#### 2. 1. 1 - Corte y obtención de los bloques de esmalte dental y dentina radicular humanos

En este estudio fueron seleccionados 50 terceros molares humanos provenientes del Banco de dientes de la facultad de odontología de la Universidad de San Pablo (USP), que se mantuvieron en la solución de timol (concentración de 1 g / l) durante 48 horas y se enfrió a 4 ° C. Después de que se realizó la descontaminación inicial de los dientes, se colocaron en un recipiente con agua destilada y desionizada para iniciar la separación de las coronas y raíces, a fin de obtener los bloques de dentina radicular y esmalte. Se utilizó una la pieza de mano de alta velocidad con un diamante de aluminio, para la realización de los cortes al nivel del límite amelocementario (UAC). Posteriormente, fue retirada la pulpa residual y cualquier tejido orgánico restante de los bloques obtenidos, el uso de cucharillas de raspado y alisado radicular (*Millenium 13 y #34 MC recta, curva #35; 28 Millenium punta fina biativa, SP, Brasil*). A continuación, fueron sometidos a limpieza de ultrasonidos (Limpiador ultrasónico único - *Thornton, único Ind E Com Ltda, SP, Brasil*) por un período de 30 minutos dividido en dos ciclos de 15 minutos para la eliminación de residuos orgánicos no removidos manualmente. Los bloques fueron colocados en vasos de precipitados de 200 ml de volumen con agua destilada y desionizada y colocados en el centro de la cuba de lavado suministrado previamente con agua, y después del primer ciclo de lavado de 15 minutos se realizó el descarte de agua y se llevó a cabo el intercambio de los contenedores. Después del segundo ciclo de lavado, el agua se descartó nuevamente, y se vertió en los contenedores 20 ml de agua destilada, descartándola al finalizar el ciclo de lavado y finalmente los vasos de precipitados se cubrieron con papel de aluminio y se almacenó en condiciones de refrigeración a 4 ° C para posterior análisis de los bloques macroscópicamente.

Poco después, se realizó la profilaxis y el raspado riguroso de los bloques para eliminación de los residuos y tártaro remanentes de la superficie coronaria y la raíz, para lo cual se utilizó pasta profiláctica hecha de piedra pómez y agua destilada de uso odontológico. Para la profilaxis se utilizó un micromotor y contra ángulo de utilidad dental (*Dabi Atlante, SP, Brasil*), y luego las raíces fueron sometidas a raspado con curetas para el alisado radicular. Inmediatamente después, las coronas y raíces fueron sometidas a limpieza con ultrasonido durante un período de 30 minutos dividido en dos ciclos de 15 minutos como se describió anteriormente, para eliminar posibles tejidos orgánicos y residuos de la pasta de piedra pómez utilizados en la profilaxis. Posteriormente, los bloques fueron secados durante 5 minutos a temperatura ambiente para evaluación macroscópica por negatoscopio.

Para el análisis macroscópico de los bloques obtenidos, se establecieron criterios de inclusión y exclusión que incluyeron las coronas y raíces libres de defectos visibles y manchas blancas en ambos tejidos duros, y fueron excluidos los bloques que no cumplían con las características anteriores.



6, 7, 8 octubre 2016

En cuanto al corte y la obtención de bloques de esmalte dental y dentina radicular, se realizó la fijación de las coronas y raíces seleccionadas de una estructura acrílica de anchura aproximadamente 4 cm y 5 cm de diámetro, para lo cual fue utilizada cera adhesiva amarilla y colocada en una lámpara caliente hasta que se fundió y se transportó a la estructura de acrílico a través de una espátula de cera, colocándose una gota de cera para la colocación en paralelo de los bordes de la corona al borde lateral de la estructura acrílica y, finalmente, se fijó por completo todo el contorno de la corona. Una vez fijada la corona a la estructura de acrílico, se procedió al montaje de la corona en el cortador manual, realizándose un corte transversal y en dirección horizontal en cortador manual (*ISOMET.*, *Buehler*, SP, Brasil), con disco de diamante de aluminio de grano fino (*Struers*, SP, Brasil). La corona a cortar fue colocada de forma adecuada al corte y semi-paralela al brazo mayor del equipo, y el disco fue direccionado en forma transversal hacia la corona con una distancia de 3 mm x 3 mm aproximadamente entre los cortes, hasta llegar a la parte basal de la corona donde se obtuvieron las muestras de esmalte dentario.

**Figura 1. Corte manual con disco de aluminio de la corona dental**



Para el corte de las raíces se llevó a cabo el mismo procedimiento realizado para el esmalte como se ha descrito anteriormente, antes de la fijación de la raíz, se subdividió en tres líneas imaginarias, en su cara frontal y de forma transversal y en dirección horizontal. Se obtuvieron los bloques de dentina radicular de aproximadamente 3 mm x 3 mm x 1.2 mm.

2. 1. 2. Pulido de bloques de esmalte dental y la dentina radicular

#### **2. 1. 2. 1. Pulido de bloques de esmalte dental**

Una vez obtenidos los bloques de esmalte y dentina radicular, se les sometió al pulido manual para el análisis inicial de la microdureza de superficie. Los bloques fueron montados en la estructura de acrílico, fijados con cera adhesiva como se describió anteriormente. En el caso de



6, 7, 8 octubre 2016

bloques de esmalte dental se fijaron en la lámina de acrílico, realizándose en primer lugar, el pulido de la superficie de dentina restante, colocándose la superficie del esmalte dirigida hacia la superficie del acrílico y la dentina a ser pulida fue colocada hacia arriba, donde posteriormente fue pulida y se obtuvo una superficie plana y paralela a los bordes de la lámina de acrílico e uso. A continuación, los bloques fueron pulidos en la *politriz* (nombre del equipo) en el que se utilizaron discos de lija de gramatura de grano diferente, iniciándose con un disco de grueso 400-800 refrigerado durante 15 segundos con una velocidad de rotación de 100 rpm, y luego con un disco de 600-1200 refrigerado durante 10 segundos con una velocidad de centrifugado de 100 rpm. Posteriormente, se utilizaron el disco 2500 durante 10 segundos a una velocidad de 100 rpm, y se finalizó con un disco de grano fino 4000 con el tiempo y la velocidad descritos anteriormente. El pulido se completó con los bloques de ultra pulido con una solución de diamante de 1 micrómetro (Buehler, Sao Paulo, Brasil), sin refrigeración, se vertió en el disco de fieltro y se ejecutó con una velocidad de 300 rpm durante 1 minuto.

El procedimiento descrito anteriormente se llevó a cabo también para la superficie del esmalte dental, inicialmente colocada hacia la superficie de la lámina, que fue colocada hacia arriba y por consiguiente, la dentina pulida fue direccionada hacia la superficie de la estructura de acrílico, la cual se fijó con cera adhesiva en los bordes laterales con precaución para evitar el contacto entre la cera y el bloque.

Al final del pulido de bloques, se obtuvieron las muestras de esmalte dental fueron sometidas a lavado en ultrasonidos durante 40 minutos divididos en 5 ciclos de 8 minutos cada uno, y se descartó el agua destilada en cada ciclo. Los vasos de precipitados fueron llenados con agua destilada y desionizada y se almacenaron durante 24 horas para posterior fijación de las muestras en la estructura acrílica.

## **2. 1. 2. 2. Pulido de los bloques de dentina radicular**

Los bloques de la dentina radicular se pulieron con la metodología utilizada para los bloques de esmalte como se ha descrito anteriormente. Ambas superficies de dentina radicular fueron pulidas y se obtuvo una superficie plana de alrededor de 3 mm x 3 mm, colocadas en la pulidora y con discos de lijado 400-800, 600-1200, 2500 y 4000 de acuerdo con el protocolo realizado previamente. Por último, estos fueron sometidos al ultra-polimento con solución diamantada de 1µm sin refrigeración y con una velocidad de 300 rpm durante 1 minuto.

Al término del pulido de bloques, las muestras de dentina radicular fueron obtenidas y sometidas al lavado por ultrasonidos como se describió para el caso anterior.

## **2. 2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE HUESOS DE CERDO MANDIBULAR**

Fueron seleccionadas mandíbulas de cerdos con un tamaño entre los 15 cm de largo por 10 cm de ancho, provistos por la Frigorífica *Raia* (*Carapicuíba*, SP, Brasil). Las mandíbulas fueron lavadas con abundante agua destilada y desionizada, y enseguida, se almacenaron en recipientes estériles en el congelador para el mantenimiento del tejido biológico, no removido o no utilizado, bajo -88 ° C.

Se llevó a cabo el proceso de eliminación del tejido blando restante en el laboratorio de preparación de muestras biológicas del Centro de Láseres y Aplicaciones, como fascias del músculo, los músculos y ligamentos que pertenecen al tejido de la estructura animal. Se utilizó una hoja de bisturí N° 15 y un mango de bisturí N° 3, además de pinzas sin dientes para el material prensado y la escisión definitiva. Fue realizado un lavado abundante con agua destilada y desionizada después de retirar completamente los tejidos remanentes, y se obtuvo una superficie de la muestra limpia y



6, 7, 8 octubre 2016

homogénea. Después de cada cirugía, las mandíbulas fueron depositadas en un plástico envolvente de cierre hermético y se almacenaron a una temperatura de  $-88^{\circ}\text{C}$  para preservación de los especímenes quirúrgicos.

**Figura 2. Región del cuerpo mandibular derecha delimitada**



**Figura 3. Región del trígono retromolar izquierdo delimitada**



Las muestras fueron divididas en dos mitades para una mejor manejo de las hemimandíbulas en ambos lados, derecho e izquierdo. Los bloques de la región del cuerpo mandibular se obtuvieron mediante corte manual con motor de baja velocidad con un disco de diamante y un disco de carburundum metálico de aluminio, por lo cual se realizó abundante riego con agua destilada para de ese modo reducir el efecto térmico después del corte. En el caso de los bloques de la región del trígono retromolar se llevó a cabo como el procedimiento descrito anteriormente.



6, 7, 8 octubre 2016

Después de que se obtuvieron los bloques de ambos grupos, estas fueron sometidas al lavado por ultrasonidos para la eliminación de los tejidos orgánicos restantes. Los bloques fueron colocados en vasos de precipitados estériles con agua destilada y desionizada, seguido de un lavado durante 8 minutos por 5 ciclos cada uno, y finalmente se almacenaron a  $-88^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### 3. 1. 1. Preparación y pulido de cerdo muestras del cuerpo mandibular

Los bloques del cuerpo del cerdo mandibulares fueron sometidos a la sección transversal vertical y en el cortador manual (*Isomet, Buehler, Sao Paulo, Brasil*) para obtención de bloques más pequeños de  $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 1,2\text{ mm}$ . Se adjuntó a la estructura de acrílico con cera adhesiva, y el hueso paralelo a los bordes de la estructura acrílica. El corte se inició en el borde exterior del bloque y continuó hasta el borde interior, tomando como distancia entre corte y corte de  $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 1,2\text{ mm}$ . Finalmente, los bloques obtenidos fueron sometidos a un lavado ultrasónico durante dos ciclos de 15 minutos y se completó 30 minutos de lavado.

Posteriormente, los bloques se fijaron de nuevo la lámina de acrílico con cera adhesiva y se realizó el pulido manual en la misma pulidora. Se inició el pulimento con discos de lijado de diferentes grosores 800, 1200, 2500 y 4000, durante 15 segundos para el primero y 10 segundos para los discos posteriores a una velocidad de 100 rpm. Por último, el ultra pulimento se realizó con una solución de diamantes  $1\text{ }\mu\text{m}$  y el disco de fieltro seco sin refrigeración con una velocidad de 300 rpm durante 1 minuto. Finalmente, el lavado de ultrasonidos se realizó para la eliminación de restos de solución de diamante. Los bloques se almacenaron en un vaso de precipitados con agua destilada y desionizada, rotulado y con refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

### 2. 1. 2. Preparación y pulimento de las muestras de la región del triángulo retromolar suína

Los bloques de la región del triángulo retromolar región obtenidos, fueron sometidos al corte vertical y transversal en el cortador manual (*Isomet., Buehler, Sao Paulo Brasil*) para obtención de bloques más pequeños de aproximadamente  $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 1,2\text{ mm}$ . Se llevó a cabo previamente el desgaste y el ajuste de los bloques, debido a la anatomía irregular de la región y el fin de hacer más fácil la fijación de la placa de acrílico. El desgaste se hizo con discos de diamante de aluminio refrigerados montados con el uso del motor a baja velocidad dental. Inmediatamente después se realizó la fijación de los bloques en la estructura de acrílico con cera caliente. Los bloques fueron sometidos al corte vertical y transversal, con una distancia entre el  $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$  cortes con el uso de disco de diamante de aluminio de grano fino (*Struers, SP, Brasil*) y sobre refrigeración manual con agua destilada y desionizada. Posteriormente, fueron sometidos al lavado por ultrasonidos como se describe anteriormente. Enseguida, se realizó el pulimento de ambas superficies, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Posteriormente, las muestras se almacenaron en vaso de precipitados estéril con agua destilada desionizada, bien cubierto durante 24 horas. Finalmente, las muestras fueron fijadas en la estructura de acrílico para el análisis de la microdureza de superficial inicial (*Baseline*).

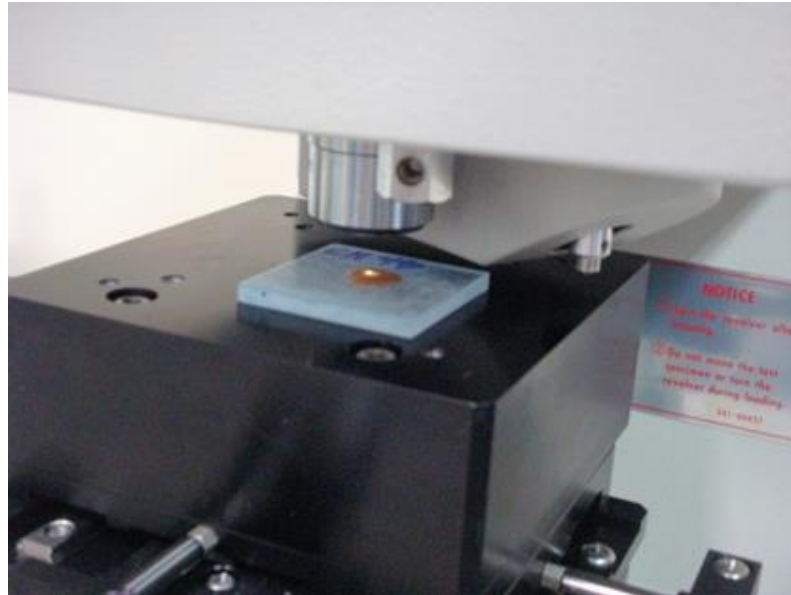
## 2. 3. ANÁLISIS DE LA MICRODUREZA SUPERFICIAL INICIAL (BASELINE)

Las muestras obtenidas a partir de los cuatro grupos de estudio fueron fijadas en la lámina de acrílico y sometidas a análisis de microdureza superficial inicial (MDS) a fin de obtener una evaluación cuantitativa de la uniformidad en las superficies de las muestras tras el pulido. Por lo tanto, para el análisis de MDS (*Baseline*), se utilizó un medidor de microdureza (*Shimadzu HMV-200, Japón*) provisto de un indentador *Knoop* que fue programado para aplicar una carga de  $245,2\text{ mN}$  (HK0, 025) durante 10 segundos (s) en el caso de las muestras de esmalte dental y una carga



6, 7, 8 octubre 2016  
de 98,4 mN (HK0, 01) durante 15 segundos (s) para las muestras de trigono retromolar, dentina radicular y el cuerpo mandibular.

**Figura 4. Análisis de microdureza de superficie inicial con indentador *Knoop***



#### 2. 3. 1. Análisis de la microdureza superficial inicial (*Baseline*)

Cada muestra de cada grupo fue colocada en el microdurómetro y se mantuvieron sin movimiento durante el análisis. Para cada muestra se realizaron 15 indentaciones subdivididas en tres filas de 5 indentaciones cada fila, que se separaron en 100  $\mu\text{m}$  de distancia a partir de un borde regular, que fue previamente seleccionado y marcado para referencia futura. La distancia entre las filas fue de 200  $\mu\text{m}$ . Después de las indentaciones de referencia, para cada muestra se calculó la media y la desviación estándar de las 15 indentaciones para verificar si la muestra era homogénea con el propósito de criterios de inclusión. Por lo cual se realizaron diagramas de dispersión se realizaron en Microsoft Excel (Microsoft Office 2013) para cada grupo, de esta forma se consiguió la selección precisa de las muestras a irradiar.

### 2. 4. IRRADIACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fueron sometidas a irradiación gamma en irradiador de Cobalto-60 (*Gammacell*, Co-60) en el Centro de tecnología de la radiación (CTR) del Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares (IPEN - CNEN / Sao Paulo, Brasil) sobre el protocolo de radioterapia convencional utilizados en pacientes afectados por cáncer de cabeza y cuello. Las muestras se colocaron en placas de Petri de material resinoso usados para cultivo bacteriológico, y luego fueron sumergidas en campos de algodón humedecidas con timol diluidas en agua destilada (0.641 g / 1 litro de agua se reduce), a fin de mantener el ambiente húmedo y evitar la proliferación de hongos.

#### 2. 4. 1. Estudio piloto para determinar la tasa de dosis

Para la determinación de la tasa de dosis usada se realizó un estudio piloto con muestras de dentina radicular, conformando dos grupos de 5 muestras cada una, las cuales fueron sometidas



6, 7, 8 octubre 2016

a dos diferentes tasas de dosis de irradiación Co-60 con una tasa de dosis del equipo para esa fecha (octubre de 2015) de 956 Gy / h y una dosis de tránsito (octubre de 2015) de 0,81 Gy:

1.-) El primer grupo fue sometido a una tasa de dosis de 10 Gy / 2,2 segundos, como una dosis única. Luego se realizó la irrigación con solución de timol y agua destilada, y se almacenó bajo refrigeración a 4°C;

2.-) El segundo grupo fue sometido a una tasa de dosis fraccionada de 2 Gy / 4,4 segundos durante 5 días consecutivos para completar una dosis total de 10 Gy. Después de cada irradiación de las muestras se riegan con la solución descrita anteriormente y se almacenó en refrigeración 4°C

Ambos grupos fueron sometidos a análisis MDS después de la irradiación. Se llevó a cabo el cálculo del promedio y la desviación estándar de las indentaciones realizadas y posteriormente se utilizó para el cálculo del porcentaje de pérdida de mineral de cada muestra. De acuerdo con los resultados obtenidos en los gráficos de dispersión y la trama, el estudio piloto ha acusado a una gran variación de los resultados iniciales y finales de MDS con una dosis de 10 Gy, como la desviación estándar obtenida, en la que decidió utilizar la tasa de dosis fraccionada 2 Gy / 4.4 segundos para todos los grupos de estudio.

#### 2. 4. 2. Irradiación de las muestras de esmalte

Las muestras de esmalte fueron colocadas en placas de Petri sumergidas en el algodón humidificado con una solución de timol y agua destilada como se ha descrito anteriormente en el estudio piloto. Estos fueron divididos en 5 muestras por cada placa de Petri.

A continuación, se inició el protocolo de irradiación en la irradiación de cobalto-60 (*Gammacell Fuente, Co-60*) con el equipo e una tasa de dosis general para el mes de marzo 2016 903 Gy / h, una dosis de tránsito de 0,76 Gy, y finalmente una dosis de 2 Gy / 4,94 segundos. La irradiación se llevó a cabo dos veces al día (4 Gy por día) con un intervalo de 8 horas para cada irradiación durante 5 días para completar una dosis semanal de 20 Gy. Después del segundo día de la irradiación, las muestras fueron irrigadas con solución Timol y luego se almacenaron en agua destilada refrigerados a 4 ° C.

#### 2. 4. 3. Irradiación de las muestras de dentina radicular

Las muestras se sumergieron en algodón dentina radicular, humedecido con solución de timol y agua destilada y se colocaron en placas de Petri. Estos se sometieron a irradiación gamma en irradiador de cobalto-60 (*Gammacell, Co-60*) con las características descritas anteriormente. Las muestras recibieron una tasa de dosis fraccionada de 2 Gy / s 4,94 en el día de completar dos veces por semana una dosis de 20 Gy. La dosis de radiación total fue de 72 Gy. Se realizó la rehidratación de las muestras después de que el segundo tiempo de irradiación de la días.

#### 1. 4. 4 - Irradiación de muestras de la región del triángulo retromolar

En el caso de la región del triángulo retromolar el procedimiento se realizó como descrito anteriormente para la dentina radicular y el esmalte dental. Estos fueron colocados en placas de Petri y fueron humedecidas con una solución de timol y agua destilada para mantener un ambiente libre de crecimiento húmedo y moho. Los bloques fueron sometidos a irradiación al día con una dosis de 4,94 dos veces al día 2 Gy / s completándose una dosis semanal de 20 Gy. Después del segundo tiempo de irradiación, que se realizó en un intervalo de aproximadamente 8 horas se llevó a cabo la



6, 7, 8 octubre 2016

rehidratación de las muestras y éstas fueron finalmente almacenadas y refrigeradas 4 ° C para la siguiente irradiación.

#### 2. 4. 5. Irradiación de muestras corporales mandibulares

El grupo de muestras del cuerpo mandibular suíno fueron colocadas en placas de Petri divididos en subgrupos de 5 muestras por placa, que fueron sumergidas en algodón humidificado para mantener el ambiente húmedo y la inhibición del crecimiento fúngico. Estas fueron sometidas a irradiación gamma en cobalto-60 de origen (*Gammacell*, Co-60) con una tasa de dosis de 4,94 fraccionado dos veces al día 2 Gy / s hasta una dosis semanal total de 20 Gy, y una dosis total de 72 Gy. Después del segundo tiempo de irradiación, las placas Petri fueron rehidratadas, almacenadas e refrigeradas 4 ° C.

**Figura 5. Fuente de *Gammacell* de cobalto- 60**





6, 7, 8 octubre 2016

**Figura 6. Placas de Petri con las muestras a ser irradiadas con tasa de dosis de 2Gy**



## **2. 5. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Fueron seleccionadas cuatro muestras para cada grupo para ser evaluados morfológicamente por microscopía electrónica de barrido (SEM). En un primer momento las muestras fueron tratadas y se preparó (acondicionamiento inicial) físicamente para su posterior análisis en el SEM como descrito anteriormente. Fueron escogidos diferentes concentraciones de etanol con el fin de deshidratar cada muestra incluida en una escala creciente: 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 96% y 100% durante 15 minutos en cada solución. Las muestras fueron examinadas en el microscopio electrónico de barrido *Tabletop Microscope TM 3000* microscopio de (*Hitachi*, Japón) del Centro de Tecnología de Materiales de la IPEN / CNEN- SP, Brasil, con una tensión de 15 kV y Analy (EDS) para obtener mayor resolución imagen con una amplia especificidad de la superficie a analizar. Para facilitar la colocación de la muestra en la porta- muestras del microscopio se utilizó un adhesivo de doble cadena-carbono conductor. Cada grupo fue sometido a deshidratación con alcohol descrito anteriormente y luego se colocaron en un desecador de sílice durante un período mínimo de 24 horas con el fin de obtener una superficie razonable para el análisis SEM. Para cada muestra analizada fueron obtenidas al menos cuatro imágenes en diferentes incrementos predeterminados, el primer análisis se realizó con una magnificación de 50X para analizar la superficie total de las muestras, posteriormente, la ampliación se aumentó de 5.000 X, X 1000 se observaron 2000 x 4000 x características estructurales y morfológicas de cada tejido duro debido a la irradiación gamma, tanto los efectos sobre la superficie en general, y las evaluaciones de las regiones específicas; Además del análisis del grupo control (sin irradiación) a fin de evaluar la homogeneidad y las características iniciales del patrón normal de los tejidos biológicos.

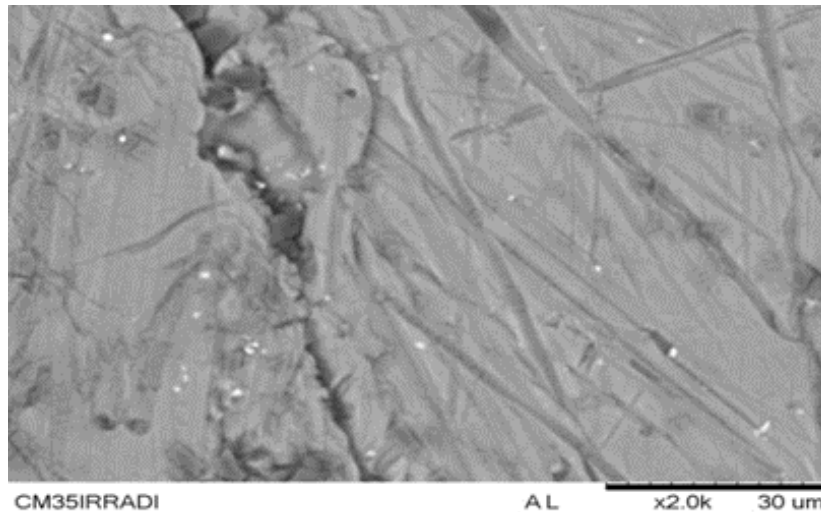
Las figuras ( **Figura 7** e **Figura 8** ) presentadas muestran las imágenes del cuerpo mandibular comprometidos por los efectos de la radiación gamma sobre la superficie de tejido duro. Presentase los trincamientos, perforaciones y líneas de fractura de las muestras sometidas a la irradiación, distinguiéndose e diferentes grados de compromiso de la estructura afectada a partir de diferentes incrementos utilizados, se observó, por otro lado u desplazamiento de los fragmentos, una pérdida de la continuidad del tejido e una superficie inicialmente lisa, plana y si agujeros o áreas perforadas. En la última figura, se presentó una fragmentación progresiva alrededor de un núcleo central con separación los bordes comprometidos, con aspecto de una fractura conminuta de la



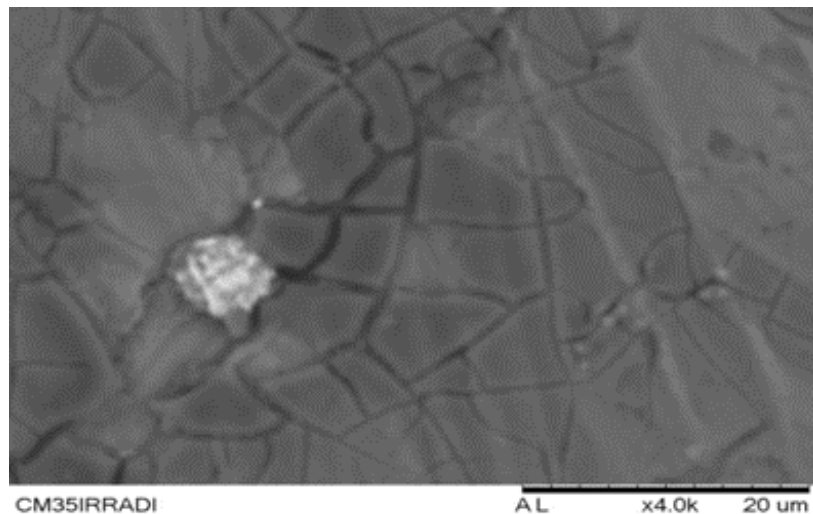
6, 7, 8 octubre 2016

superficie del cuerpo mandibular. Por otra parte, se mostró y resaltó la peculiaridad de esta muestra por el hecho de mostrarse diferentes tipos de trincamientos con profundidad reducida y una fina línea de fractura central.

**Figura 7. Muestra de cuerpo mandibular con aumento de 2000x**



**Figura 8. Muestra de cuerpo mandibular d con aumento de 4000x**

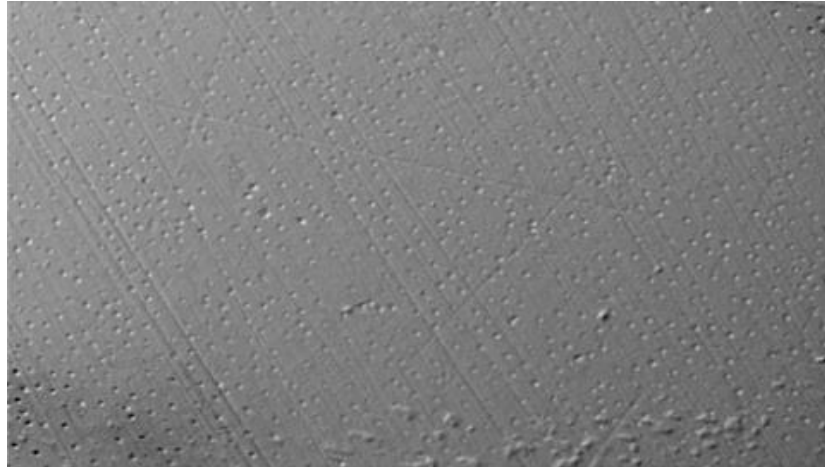


La **Figura 9**, presenta una imagen de una de las muestras de la región del triángulo retromolar antes de la irradiación gamma, después del pulido mecánico, en el que se puede observar una superficie lisa y uniforme, que corresponde a un tejido aparentemente sano en el nivel macro, analizado con un aumento en la porosidad observó 500x, en este caso se refiere al trabeculado y canales de Haversianos presentes.



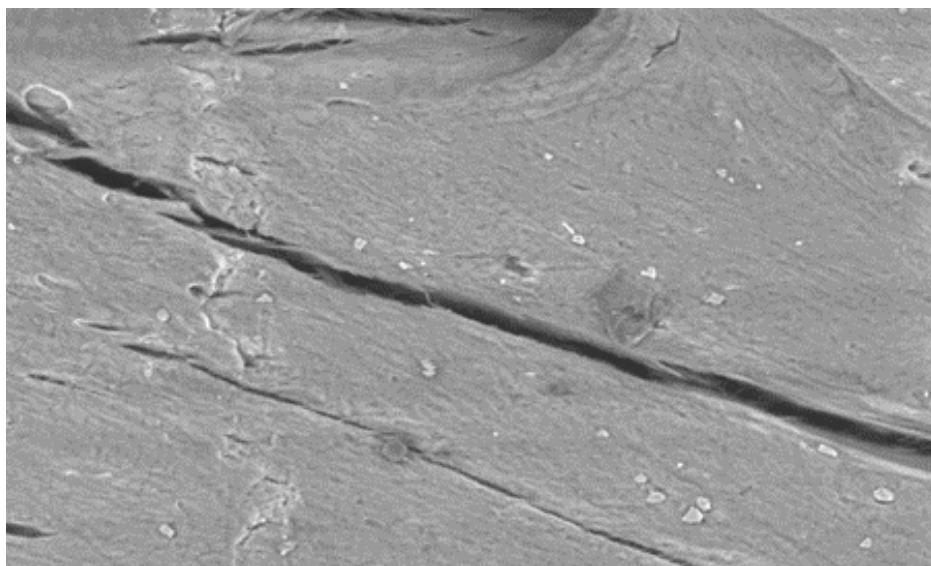
6, 7, 8 octubre 2016

**Figura 9. Muestra de la región del triángulo retromolar antes de la irradiación gamma**



La **Figura 10**, presenta una imagen de la muestra de la región retromolar después de la dosis total recibida por la radioterapia gamma (72 Gy). Esto demuestra una alteración acentuada de la superficie analizada la cual presentó un agrietamiento de longitud considerable, además de observarse grietas de menor tamaño de toda la región superior, con lo que se considerase que el efecto de la radiación en el sitio irradiado ha ejercido un efecto deletéreo importante sobre mencionada localidad cuando se compara con las otras localidades en la superficie. Además, la inestabilidad estructural causada por la radiación gamma conduce una mayor destrucción, como comprobada con la pérdida de dureza de la superficie descrito anteriormente.

**Figura 10. Muestra del triángulo retromolar después de la irradiación gamma (72 Gy)**



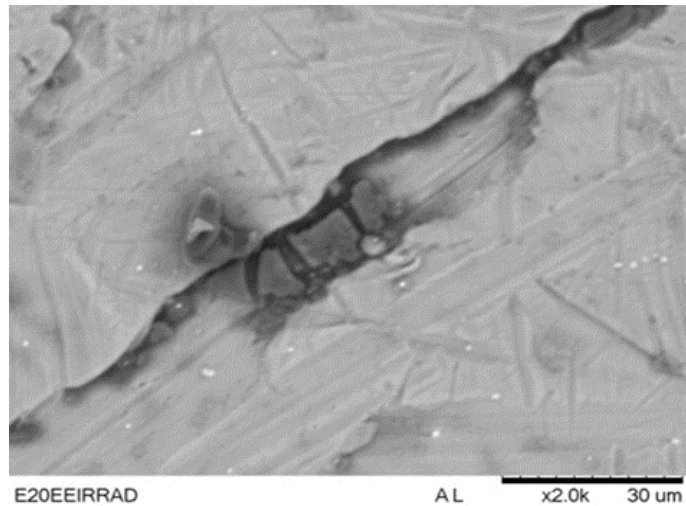
La **Figura 11** e **Figura 12**, representan imágenes de la muestra del esmalte dental después de la irradiación e diferentes aumentos microscópicos. Se observa un claro deterioro y desintegración de la superficie del esmalte, así como la presencia de trincamientos y líneas de fractura en la zona



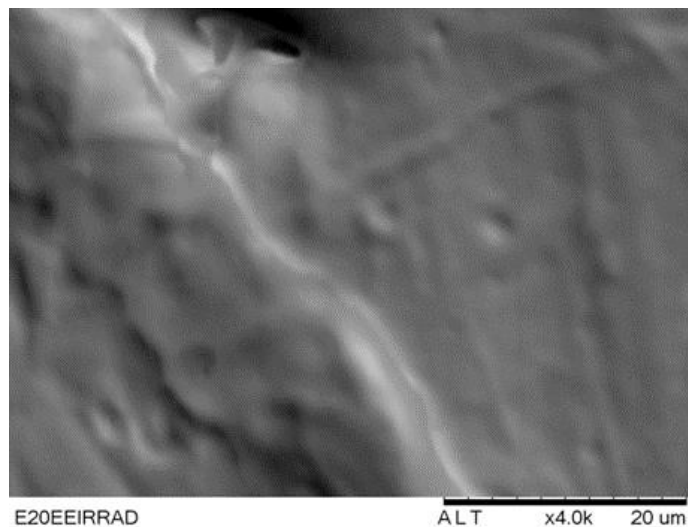
6, 7, 8 octubre 2016

central. La muestra, como descrito anteriormente, fue sometida a la irradiación gamma con una dosis total de 72 Gy. Por otro lado, con un aumento microscópico de 2000 x se distinguió un quiere de la estructura de mayor longitud a nivel de la superficie, de forma irregular y desigual, debido al efecto ejercido por la radiación gamma y la afección de la integridad estructural, incluyéndose numerosos fragmentos de tejido duro afectados. Finalmente, la imagen D, se observa una clara línea de fractura en la superficie, de considerable longitud, resaltada en mayor aumento (x 4000).

**Figura 11. Muestra de esmalte dental después de la irradiación gamma con u aumento de 2000x**



**Figura 12. Muestra de esmalte después de la irradiación gama con un aumento de 4000x**

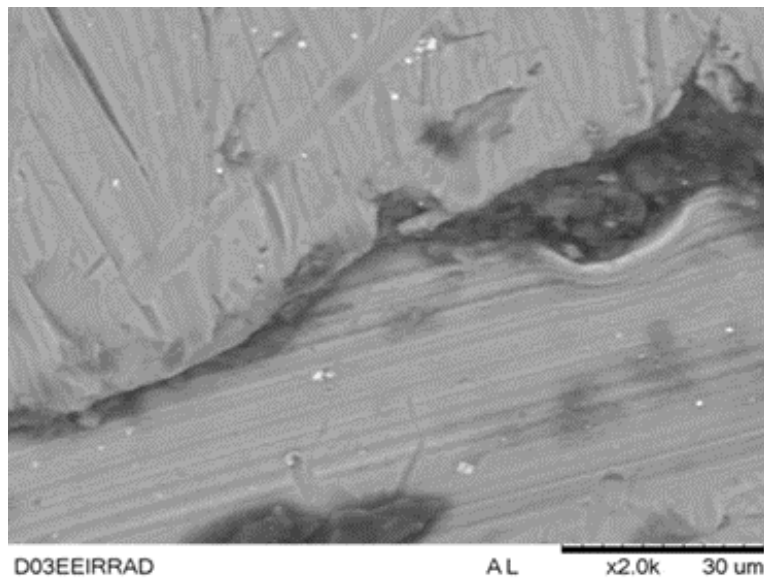




6, 7, 8 octubre 2016

Las **Figura 13** e **Figura 14** representan las imágenes de la dentina radicular después de la irradiación gamma. Con respecto a la **Figura 13** con un aumento de 2000 x, realizada en un ángulo de la superficie de la muestra, se destacó una línea de fractura con un leve desplazamiento de los bordes comprometidos y una pérdida de continuidad del tejido mineralizado. Por último, se observa en la **Figura 14** a lo largo del eje mayor de la muestra de un quiebre de la superficie que se extiende sobre la mayor parte de la muestra, visualizándose por medio del modo de imagen topográfica y claramente se evidenció el efecto perjudicial causado en la superficie de la muestra irradiada, con una lente de aumento 4000x.

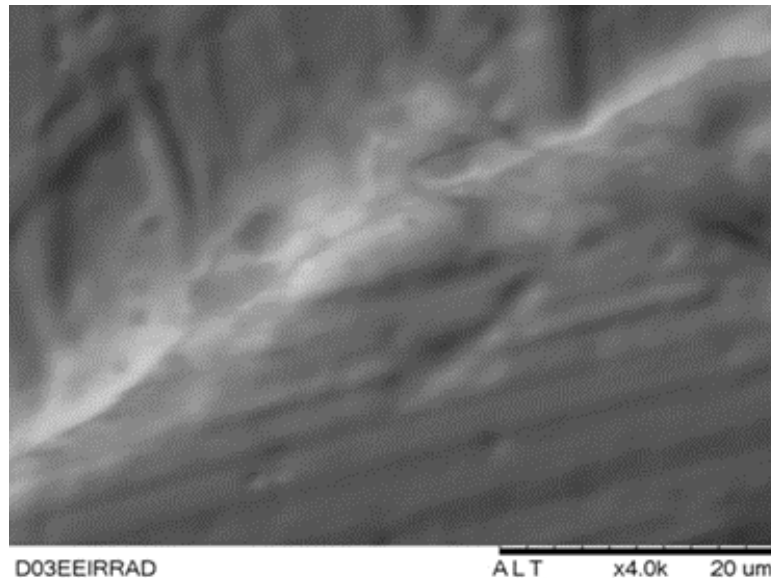
**Figura 13. Muestra de dentina radicular después de la irradiación gamma con un aumento de 2000x**





6, 7, 8 octubre 2016

**Figura 14. Muestra de la dentina radicular después de la irradiación gamma con un aumento de 4000x**



## 2. 6. ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA ATR - FTIR

Las muestras irradiadas y no irradiadas fueron analizadas por espectroscopia infrarroja por transformada de *Fourier* en el espectrofotómetro infrarrojo FTIR (*Perkin - Elmer*, 100) (**Figura 15**) del Centro de Tecnología de Radiación (CTR) de IPEN / CNEN San Palo, Brasil, cuyos espectros fueron obtenidos por reflexión total atenuada (ATR), una banda de frecuencia de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ , y una adquisición de precisión  $4\text{ cm}^{-1}$ . Fueron elegidas un mayor número de exploraciones después de los recientes informes en la literatura<sup>32</sup> para obtención de los espectros de los tejidos duros de la cavidad bucal, completándose un total de 80 exploraciones con sustracción de fondo (BG). El cristal que componía el equipo para el análisis fue seleniuro de zinc (ZnSe), para obtención de un análisis bioquímico, cualitativa y semi-cuantitativa de materia orgánica presente en el mismo. Las muestras fueron retiradas de las láminas acrílicas y posicionadas por encima del cristal de ZnSe para obtención de los espectros generados por la transformada de *Fourier*. Poco después de las muestras ser retiradas y colocadas en el centro del cristal, seguido por el ajuste contra el cristal, fue utilizada una fuerza de torque específica de 130 N lo que permitió un análisis exacto y preciso de muestras (**Figura 16**).

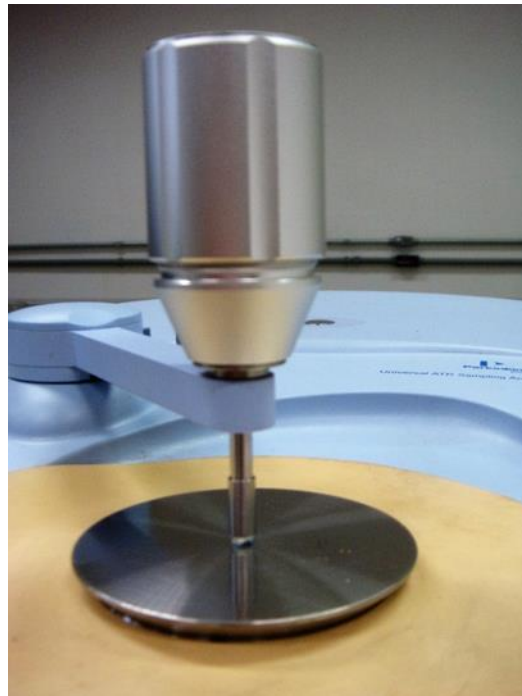


6, 7, 8 octubre 2016

**Figura 15. Espectrofotómetro FTIR para análisis por la técnica de reflexión total atenuada**



**Figura 16. Análisis por reflexión total atenuada de las muestras, con la aplicación de una fuerza de torque de 130 N**



#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

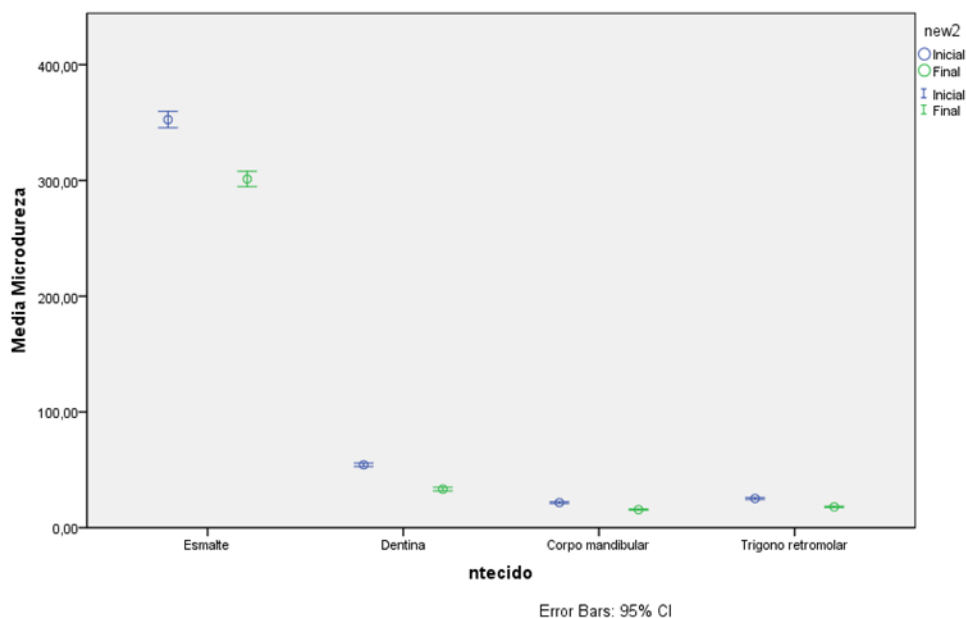
Después del análisis de microdureza de superficie de los tejidos duros de la cavidad bucal antes y después de ser sometidos a la irradiación gamma simulado en un modelo *in vitro* con la dosis usada en el tratamiento de un paciente afectado por cáncer de cabeza y cuello, los resultados preliminares mostraron, en general, una gran disminución de la dureza de la dentina radicular y el hueso mandibular principalmente de acuerdo con estudios anteriores, y en el caso del esmalte dental, que mostró un descenso de los valores iniciales de dureza, y en algunos casos, mostró un



6, 7, 8 octubre 2016

aumento de la misma que valores más altos que el inicial correspondiente a los resultados obtenidos por otros estudios<sup>14, 16, 17, 18</sup>. Los resultados fueron agrupados y explorados estadísticamente a través de pruebas de normalidad, homogeneidad e independencia de la misma, por lo cual fueron establecidos posteriormente los modelos estadísticos usados en el presente estudio. Se utilizó la prueba t de Student de promedios relacionados para cada grupo de estudio, obteniéndose finalmente un valor de  $p = 0,00$  (95%), un valor estadísticamente significativo y por lo cual se rechazó la hipótesis nula, es decir, que existió diferencia significativa entre los valores iniciales y finales de microdureza de superficie en todos los grupos de estudio, y se observó por medio de una clara disminución de los valores iniciales de microdureza cuando se comparó con los resultados finales, y por consecuencia se evidenció una pérdida sustancial de dureza en todos los grupos de estudio como mostrado en la Figura 17.

**Figura 17. Test de student para análisis de los promedios de la microdureza de superficie**



Sin embargo, en el caso del grupo dentina radicular cuando aplicada la prueba estadística de ANOVA, se mostraron valores superiores e los resultados diferenciales cuando se comparó con los otros tejidos duros de mayor contenido orgánico, tales como el cuerpo de la mandíbula y la región del triángulo retromolar, sin embargo, los resultados fueron inferiores cuando comparados con los valores obtenidos para el esmalte dentario. Finalmente, en el caso de los valores obtenidos para el cuerpo mandibular y el área de la retromolar, según el test de ANOVA, estos presentaron resultados similares en lo que respecta a la diferencia entre los valores iniciales y finales de dureza de la superficie, por lo que se observó que no existió diferencia estadísticamente significativa entre los resultados ( $p=0,97$ ). Este resultado probablemente conduzca a afirmar que el efecto ejercido por la radiación gamma en ambas regiones fue similar.

En el caso de la **Figura 18**, el esmalte dental presentó, según el test estadístico de ANOVA, un mayor valor e la diferencia de los promedios de la microdureza superficie inicial y el final, lo que demuestra una mayor comprometimiento de la dureza superficie del esmalte por la radiación gamma, debido a los valores finales claramente disminuidos, obtenidos después de ser aplicada la dosis total



6, 7, 8 octubre 2016

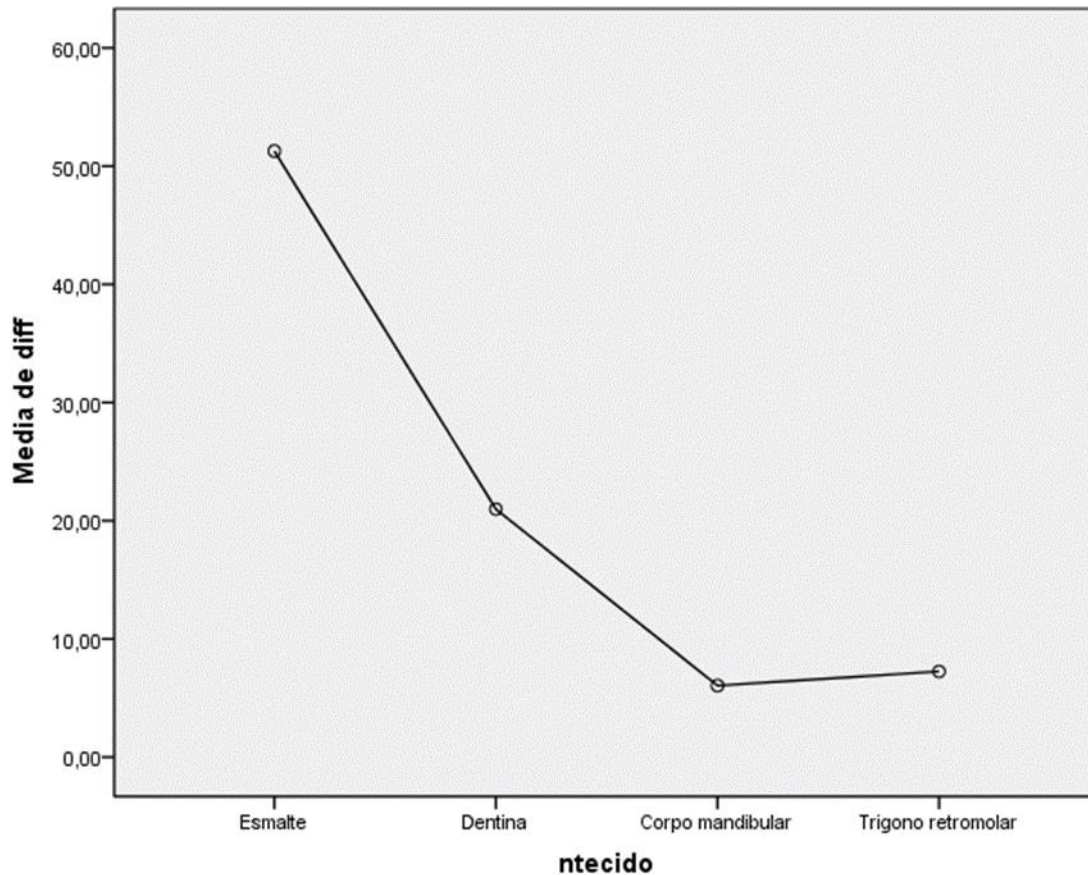
de 72 Gy. Con respecto a la dentina, como descrito anteriormente, se obtuvo un valor de la diferencia de los promedios iniciales y finales más bajo en comparación con el esmalte y más alto en comparación con las regiones del hueso mandibular. De acuerdo con la literatura reciente <sup>6, 14, 16</sup>, la dentina presenta una mayor incidencia de comprometimiento y mayor es el grado de destrucción por la radiación gamma, teniendo en cuenta su composición orgánica y contenido de agua, con respecto al esmalte dental, además de la acción de proteasas y metalo-proteasas activadas durante el proceso de degeneración y desnaturalización proteica. En este estudio, la dentina radicular mostró una tasa de comprometimiento menor estadísticamente significativo ( $p=,00\%$ ) en comparación con el esmalte, aunque algunos estudios mostraron resultados similares a este estudio, sin embargo, con una dosis umbral determinado utilizado (dosis de hasta 30 Gy presentaron una pérdida de mayor dureza que a dosis más altas).

Los resultados presentados en este estudio respecto al esmalte dental implicaría una nueva evaluación y realización de estudios más específicos para esclarecer la acción directa de la radiación gama sobre este tejido, evaluándose desde el modo de aplicación de la radioterapia hasta el análisis bioquímico e molecular de la progresión de la destrucción e este tejido duro, lo que generaría la aparición de la caries de radiación de rápido progreso. La caries de radiación se caracteriza por el rápido avance y destrucción que se produce en los dientes de los pacientes sometidos a radioterapia, lo que representa un tratamiento a ser instaurado de alta complejidad y de difícil manejo, además de las secuelas física y psicológicas que involucra en estos pacientes, y que posiblemente se justificaría por el claro efecto deletéreo sobre el esmalte dental, como se demuestra en este estudio, como representado en la **Figura 18**.



6, 7, 8 octubre 2016

**Figura 18. Promedio de la diferencia entre la microdureza de superficie inicial y final intergrupar a través del test de ANOVA**



#### 4. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados preliminares se estableció una primera conclusión de este estudio destacándose el efecto directo de la radiación ionizante, como un factor determinante y contribuyente en la pérdida de las propiedades físicas, morfológicas y estructurales de los tejidos duros sometidos a la radioterapia convencional a partir de un modelo desarrollado *in vitro*, con la dosis utilizada en el tratamiento de pacientes afectados por cáncer de cabeza y cuello, lo que favorece indiscutiblemente la aparición de los efectos indeseables de esta modalidad terapéutica, independiente de los factores que contribuyen locales o sistémicos.



6, 7, 8 octubre 2016

## 5. REFERENCIAS 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](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 CaF<sub>2</sub>-like products formation because of professional acidulated fluoride or to domestic dentifrice application. *Microsc Res Tech.* Vol 76(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 Lasr irradiation and mechanical Bur. *J Dent (Shiraz)*.



6, 7, 8 octubre 2016

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 Introdutório de Microscopia Eletrônica de Varredura, 2º 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. *Archive 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 Edicao: 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.



6, 7, 8 octubre 2016

22. TRENTO C.L. Densitometria óssea em mandíbula de suínos submetidos a enxerto ósseo autógeno, homogéneo e heterógeno. 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
32. ZECELL et al. FTIR Spectroscopy Revealing the Effects of Laser and Ionizing Radiation on biological Hard Tissues. *Brazilian Journal of Chemistry Society*. 26(12): 2571-2582, 2015