

XV CONGRESO PERUANO DE  
CIRUGIA BUCAL Y MAXILOFACIAL

CUSCO - Perú  
6, 7, 8 Octubre 2016



**ipen**



## ESTUDIO *IN VITRO* DE LA COMPOSICIÓN Y LA MICRODUREZA DE LOS TEJIDOS DUROS DE LA CAVIDAD BUCAL SOMETIDOS A IRRADIACIÓN GAMA CON LA DOSIS PROGRAMADA EM EL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES COM CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

**Expositor: Wilber E. Bernaola P.**



**Delvonei Alves de Andrade / Sandra E. Flores/ Áurea B. Geraldo**

Centro de Lasers e Aplicações / Centro de Tecnologia das Radiações  
Centro de Caracterização e Tecnologia dos Materiais – IPEN/CNEN

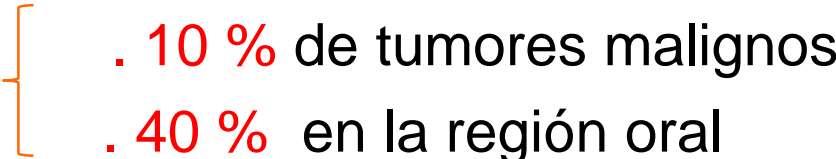

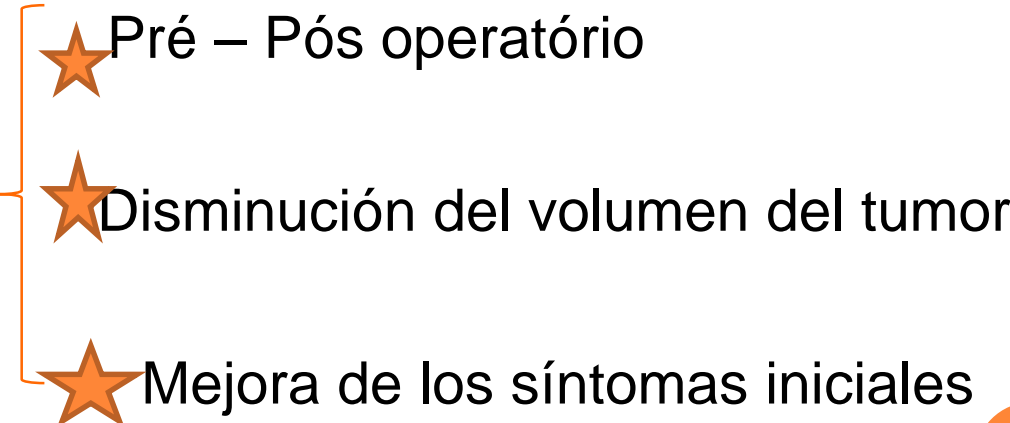


**CNEN**  
Comissão Nacional  
de Energia Nuclear

Ministério da Ciência,  
Tecnologia e Inovação



# INTRODUCCIÓN

- Aumento de la incidencia de los tumores de cabeza y cuello
- 
  - . 10 % de tumores malignos
  - . 40 % en la región oral
- Carcinoma espinocelular (90%) → INCA 2016-17
- Métodos tradicionales de tratamiento
  - . Cirugía
  - . **RADIOTERAPIA** 
  - . Quimioterapia
  - . RT + QT
  - ★ Pré – Pós operatório
  - ★ Disminución del volumen del tumor
  - ★ Mejora de los síntomas iniciales

# COMPLICACIONES DE LA RADIOTERAPIA

- Daño a las células tumorales y normales adyacentes (mecanismo inespecífico de la radiación ionizante en los tejidos vecinos) → Cuidados preventivos

- **Efectos secundarios:**

- . Xerostomia

- . **Caries de la radiación**

- . Mucositis

- . **Osteorradionecrosis**

Dependerán :

- . **Dose total (+50 Gy)**

- . Dose biológica

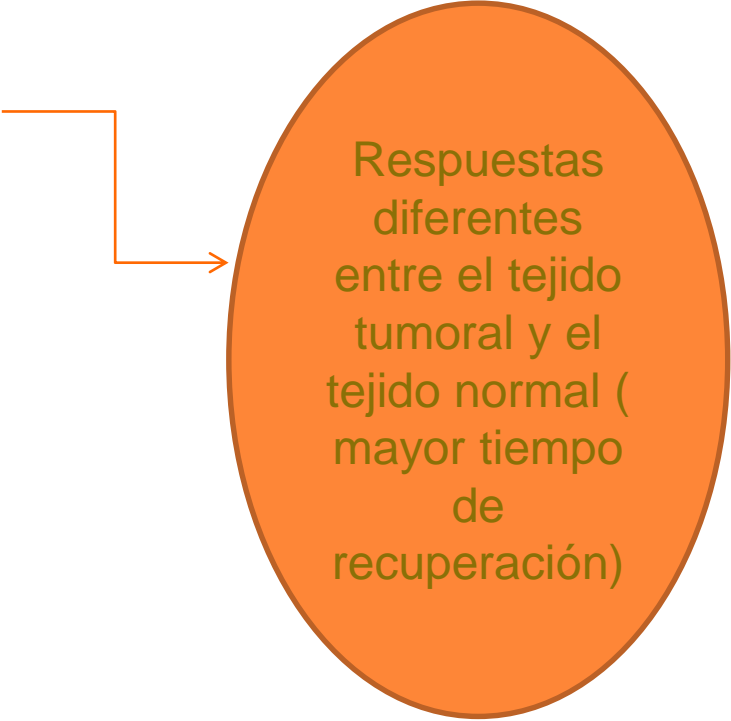
- . Tamaño del campo irradiado

- . **Número e intervalo de sesiones**

# VARIACIONES EN LAS TÉCNICAS DE RADIOTERAPIA

## I. JUSTIFICACIÓN

- Fraccionamiento de la dosis :



Respuestas diferentes entre el tejido tumoral y el tejido normal (mayor tiempo de recuperación)

## ii. NOVAS TÉCNICAS

- Hiperfraccionamiento de la dosis
- Fraccionamiento acelerado de la dosis
- Radioterapia conformacional en tercera dimensión (3D)
- Radioterapia de intensidad modulada (IMRT)

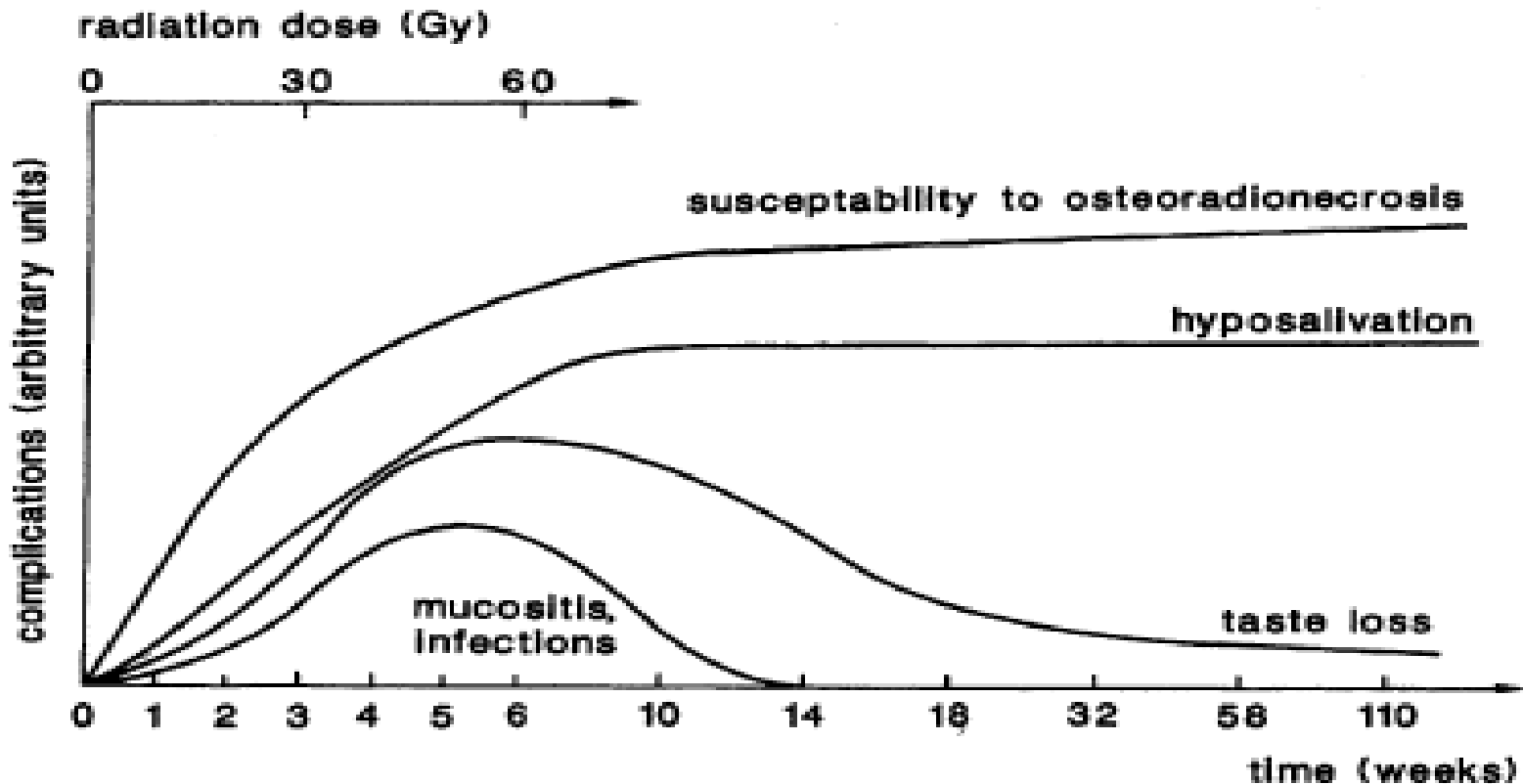
Sin embargo



**COMPLICACIONES AÚN  
PERSISTEN**



**Gráfico 1.** Diagrama esquemático mostrando el tiempo de aparición y duración de las complicaciones inmediatas, mediatas y tardías de la radioterapia en el transcurso y después del tratamiento de radioterapia según las dosis administradas



**Figure 2.** Schematic diagram illustrating time of onset and duration of radiation-induced oral sequelae (modified after Maxymiw and Wood, 1989).

# Complicação tardia da Radioterapia : Osteorradioneecrose

## Osteorradioneecrose (ORN)

### Aspectos conceituais

Complicação severa, séria e tardia do tratamento radioterápico de difícil tratamento (OMS)

Exposição de osso necrótico sem recuperação espontânea (área = > 1cm, 6 meses)

Incidência: maior nas últimas décadas (1-30%)  
**ORN MANDIBULAR : 0,4 – 56%**

### Etiopatogenia

- . Doença periodontal
- . Agentes traumáticos
- . **DOSE DA RADIOTERAPIA (> 60 Gy)**

### Fisiopatologia

- . Osso hipovascular, hipóxico, hipocelular
- . Destrução de osteócitos
- . Ausência de osteoblastos
- . Falta de novo osteóide

# OSTEORRADIONECCROSIS : CASO CLÍNICO

(HOSPITAL AC CAMARGO CÁNCER CENTER – SÃO PAULO, BRASIL )



Fig. 1 Radiografía pré-operatória inicial de la lesión de osteorradionecrosis em la región directa de la



Fig2. Estado clínico de la lesión después de tres meses de detección clínica



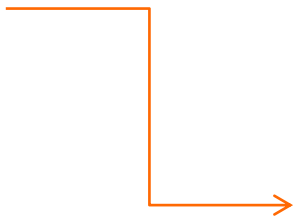
Fig3. Estado dentário doel paciente presentando uma acentuada destrucción generalizada



Fig3. Fístula extraoral con perforación cutánea después de 6 meses de haber sido detectada

# JUSTIFICACIÓN

- Existen pocos estudios reportados en la literatura al respecto de los efectos DIRECTOS de la radiación ionizante (gama) en la composición y la microdureza de los tejidos duros de la cavidad bucal, por eso surge la necesidad de desarrollar un protocolo *in vitro*
- - En el futuro establecer protocolos en animales de experimentación, *in vivo*, además de técnicas de tratamiento innovadoras específicas basados en los efectos directos de la radiación ionizante.



# OBJETIVOS DEL ESTUDIO

## General

**Evaluar *in vitro*** las alteraciones morfológicas, variaciones del contenido mineral y alteraciones bioquímicas del esmalte dental, la dentina radicular y el hueso mandibular después de la radiación gama.

## Específicos

**Evaluar a través de examen directo** por Microscopio electrónico de Barredura después de la radiación gama.

**Evaluar** las diferencias entre los valores de microdureza superficial inicial y final de los tejidos duros que componen el estudio..

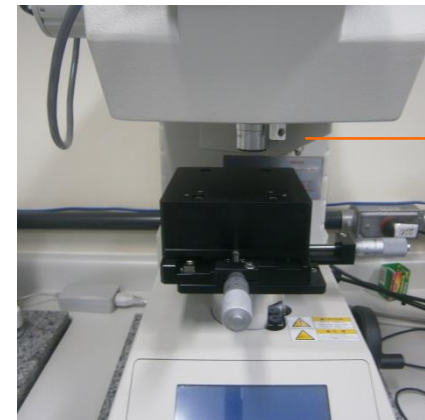
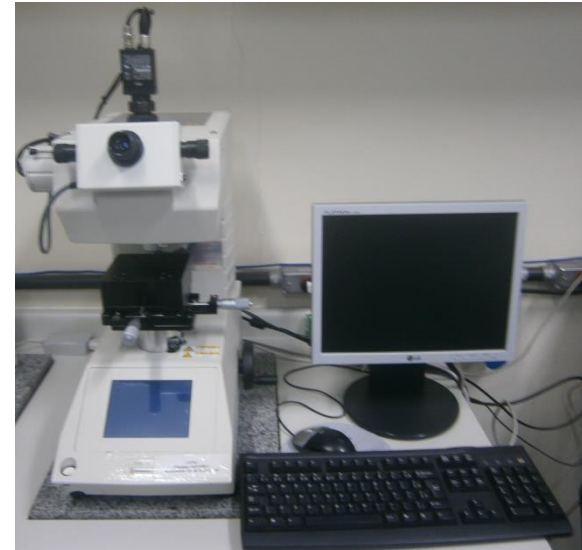
**Evaluar** las variaciones bioquímicas de forma cualitativa y semi-quantitativa de los tejidos duros después de la radiación gama a través de la técnicas por Espectroscopia en el infrarrojo por Transformada de *Fourier* (ATR-FTIR).

# ANÁLISIS DE LA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE (BASELINE)

- **Justificación :**
  - **Indicador indirecto del contenido mineral**
- Alta confiabilidad
- Disminución de los errores experimentales



Homogenización de las muestras iniciales



Indentador  
KNOOP

# ANÁLISE DE MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE (MDS)

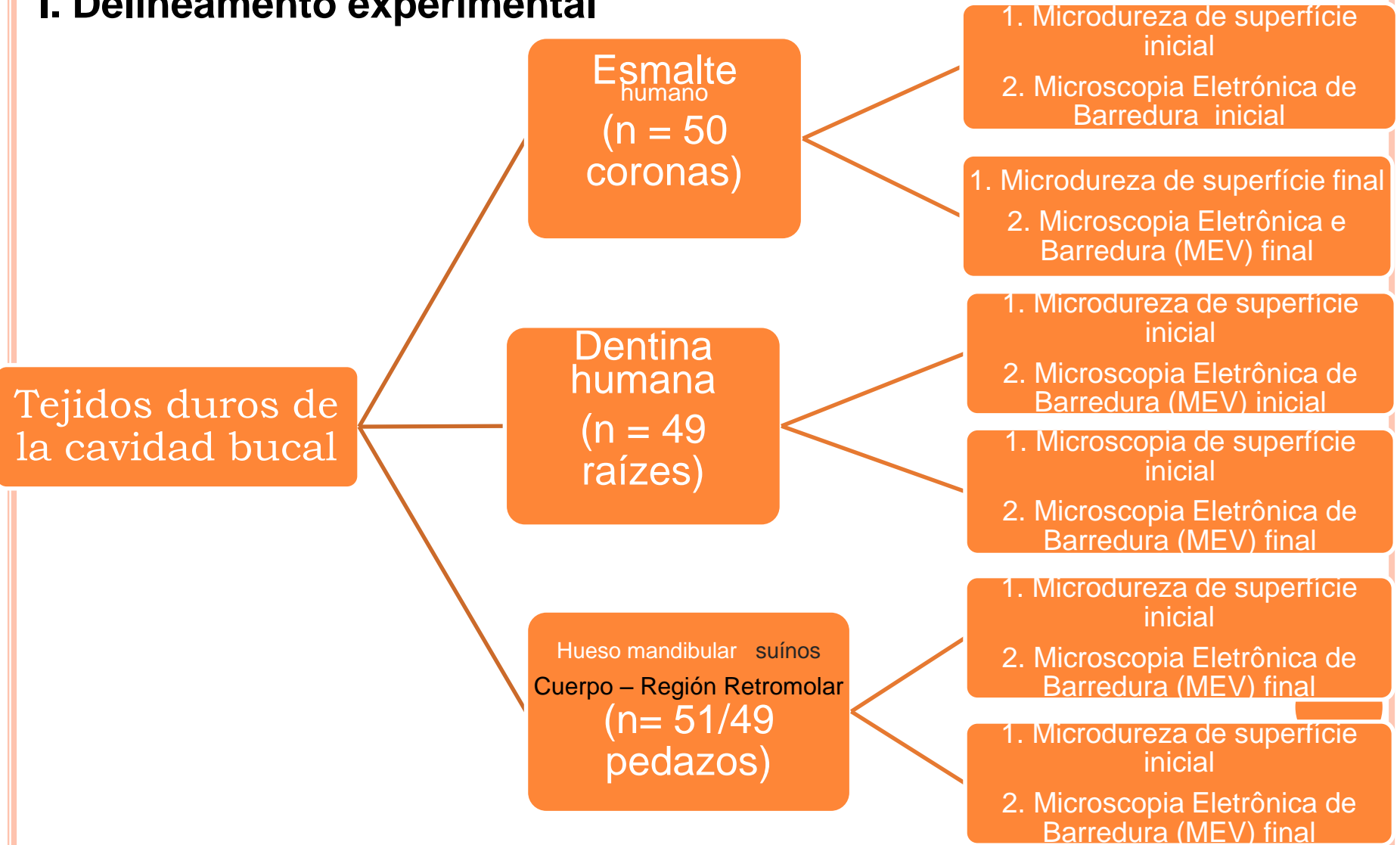
**GARANTIZAR** la homogenidad de las muestras después del pulimento

**DETERMINAR** la pérdida de porcentaje de la microdureza de superficie después de la irradiación gama.

Superfícies reactivas      **PULIDAS:**      más

# MATERIALES Y MÉTODOS

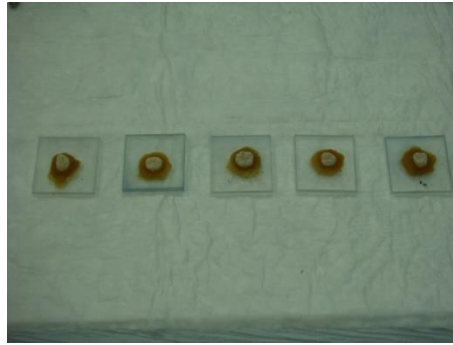
## I. Delineamiento experimental



# PREPARO E PULIMENTO DE LAS MUESTRAS TEJIDOS DUROS (ESMALTE, DENTINA)



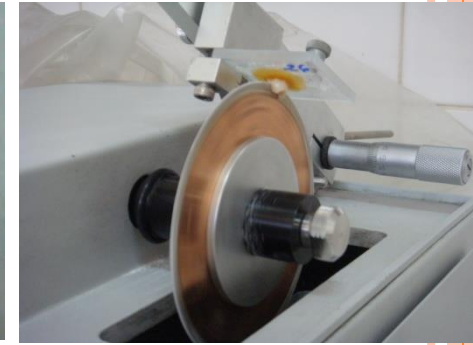
**Passo 1: Uso de cera pegajosa para fixação de coroas e raízes**



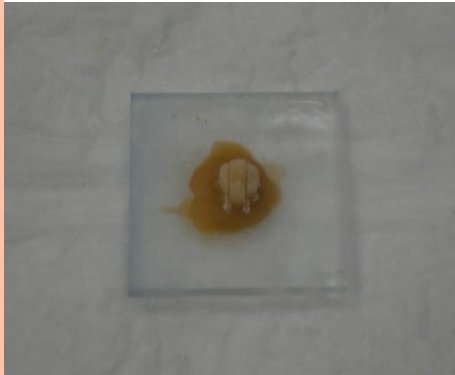
**Passo 2: Fixação das coroas a lamina de acrílico para elas serem cortadas**



**Passo 3: Fixação das raízes a lamina de acrílico**



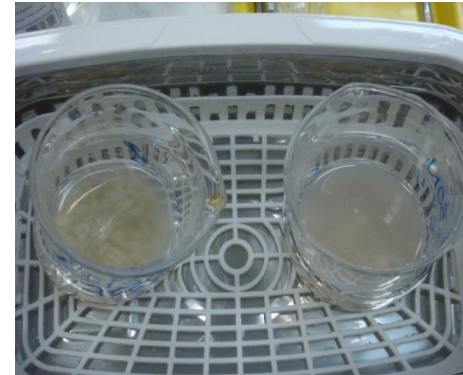
**Passo 4: Corte manual das coroas e raízes na cortadeira Strauers**



**Passo 5: Blocos de esmalte após o corte das coroas para eles serem retirados**



**Passo 6: Blocos de esmalte e dentina radicular armazenados em recipiente com água destilada e ultrassom**



**Passo 7: Blocos de esmalte e dentina obtidos submetidos a lavagem em ultrassom**



**Passo 8: Polimento das amostras será feito na politriz com diferentes discos de lixa de gramatura**

# PREPARO DE LAS MUESTRAS DE HUESO MANDIBULAR SUÍNO

(CUERPO MANDIBULAR Y REGIÓN RETROMOLAR)

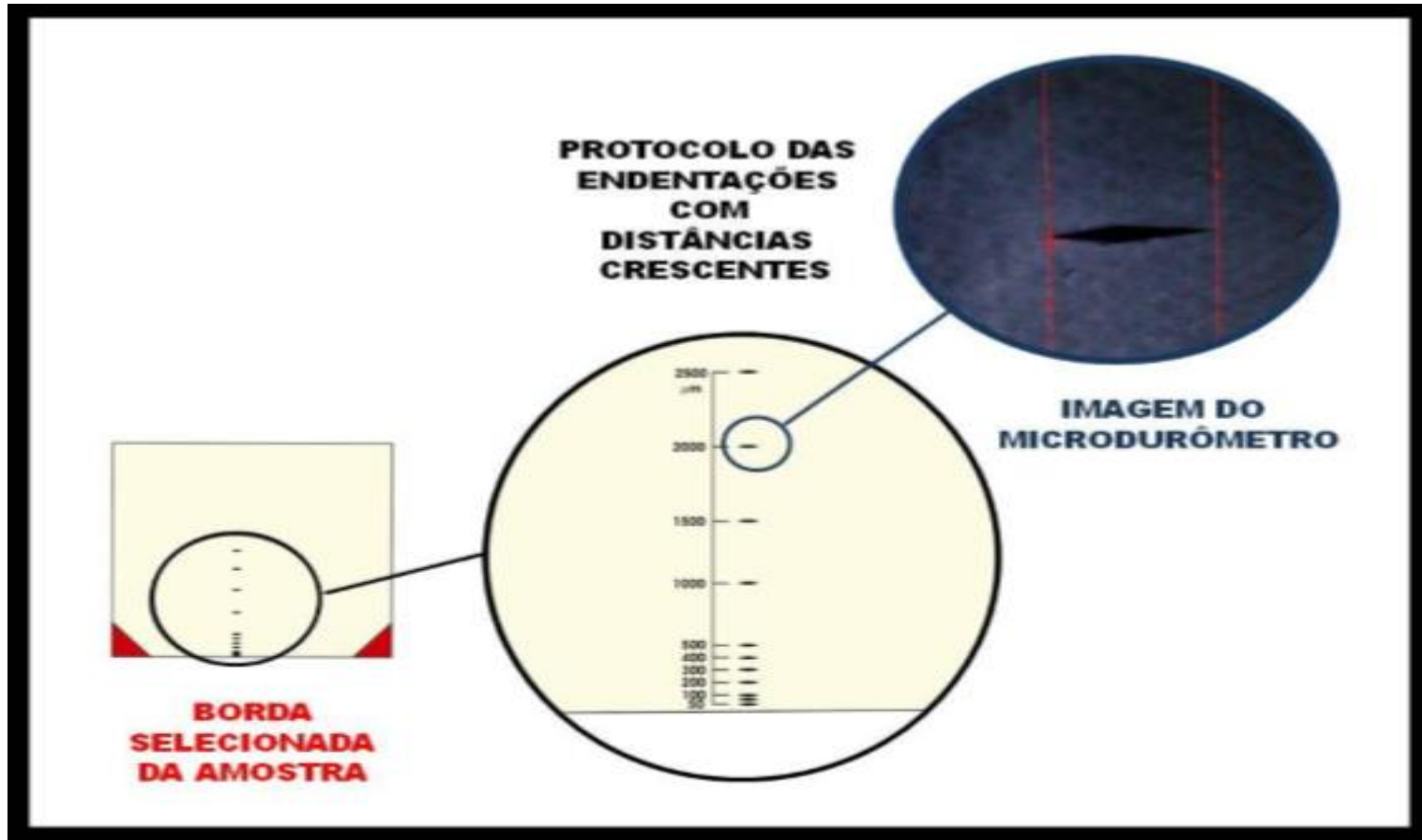


**Fig. 4. 2. 2 Delimitación de la región medial del cuerpo mandibular de lado izquierdo para obtención de los blocos de 3 x 3 x 1,2 mm**



**Fig. 4. 2. 3 Delimitación de la región interna del triángulo retromolar izquierdo para obtención dos blocos de 3 x 3 x 1.2 mm**

# DISEÑO PARA LA OBTENCIÓN DE LA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE INICIAL(MDS)



**Figura: Protocolo de indentación para determinar la microdureza de superficie inicial de las muestras en estudio**

# PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO

- Grupos:
  - (por tecido)
  - . Esmalte dentário (50 amostras)
  - . Dentina radicular (49 amostras)
  - . Corpo mandibular ( 51 amostras)
  - . Trígono retro molar (49 amostras)
- Equipamento
  - . Fonte *Gammacell* Cobalto -60
  - . Centro de Tecnologia das Radiações (CTR)
- Transporte
  - . Placas de Petri de 15 cm x 14,5 cm
- Dose de radiação gama
  - . Dose total: 72Gy
  - . Taxa de dose: 2 Gy /4,4 segundos
  - . Tempo: c/5 dias x (4 semanas).

# IRRADIACIÓN GAMA DE LAS MUESTRAS

(SEGÚN DOSIS PROGRAMADA EM EL TRATAMIENTO PARA PACIENTES COM CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO )



Fonte *Gammacell* de Cobalto -60

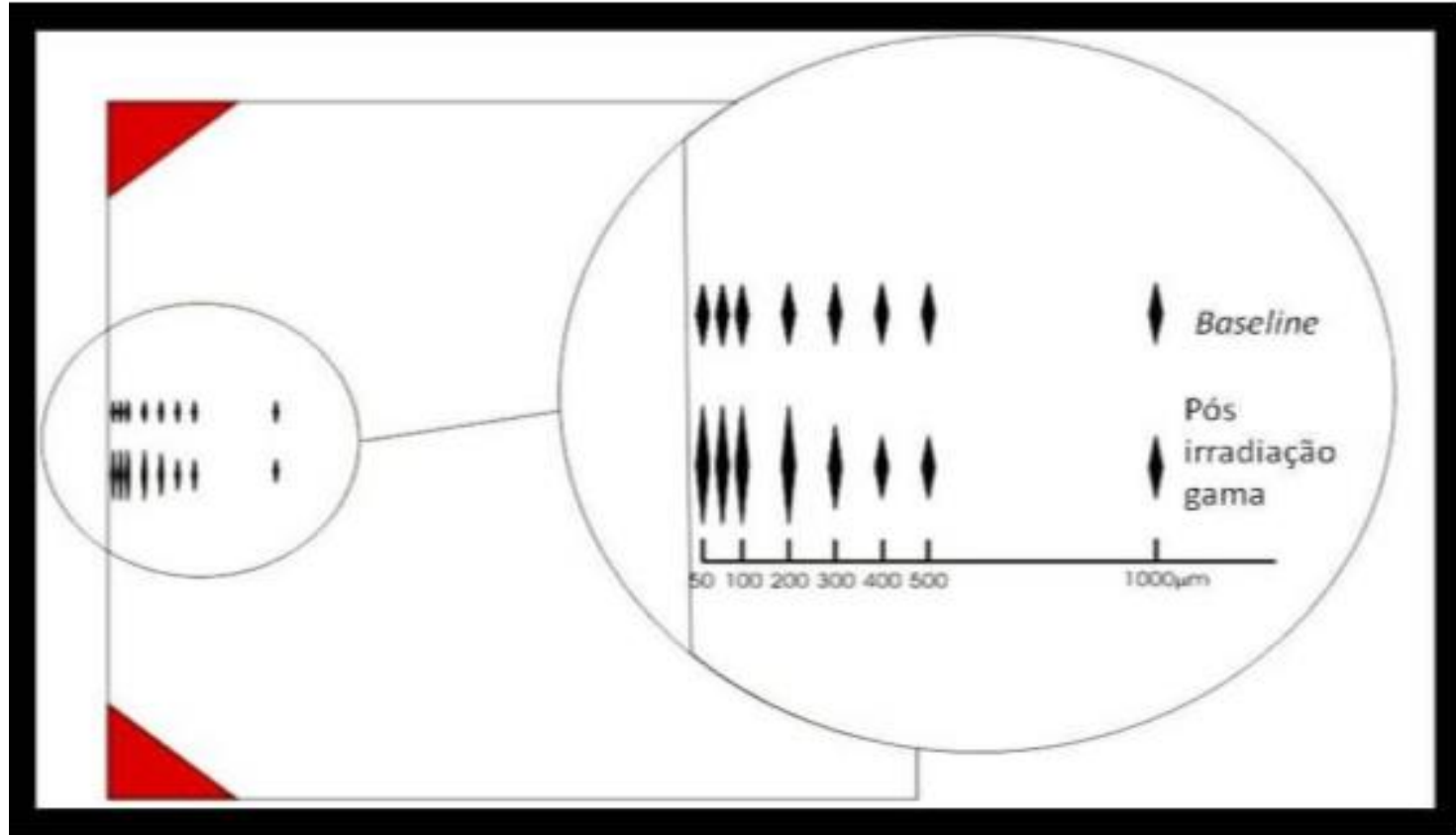


Posicionamento das placas de Petri para serem submetidas a irradiação gama



Taxa de dose: 2 Gy /4,4 segundos, recebida duas vezes por dia (DOSE TOTAL : 72 GY)

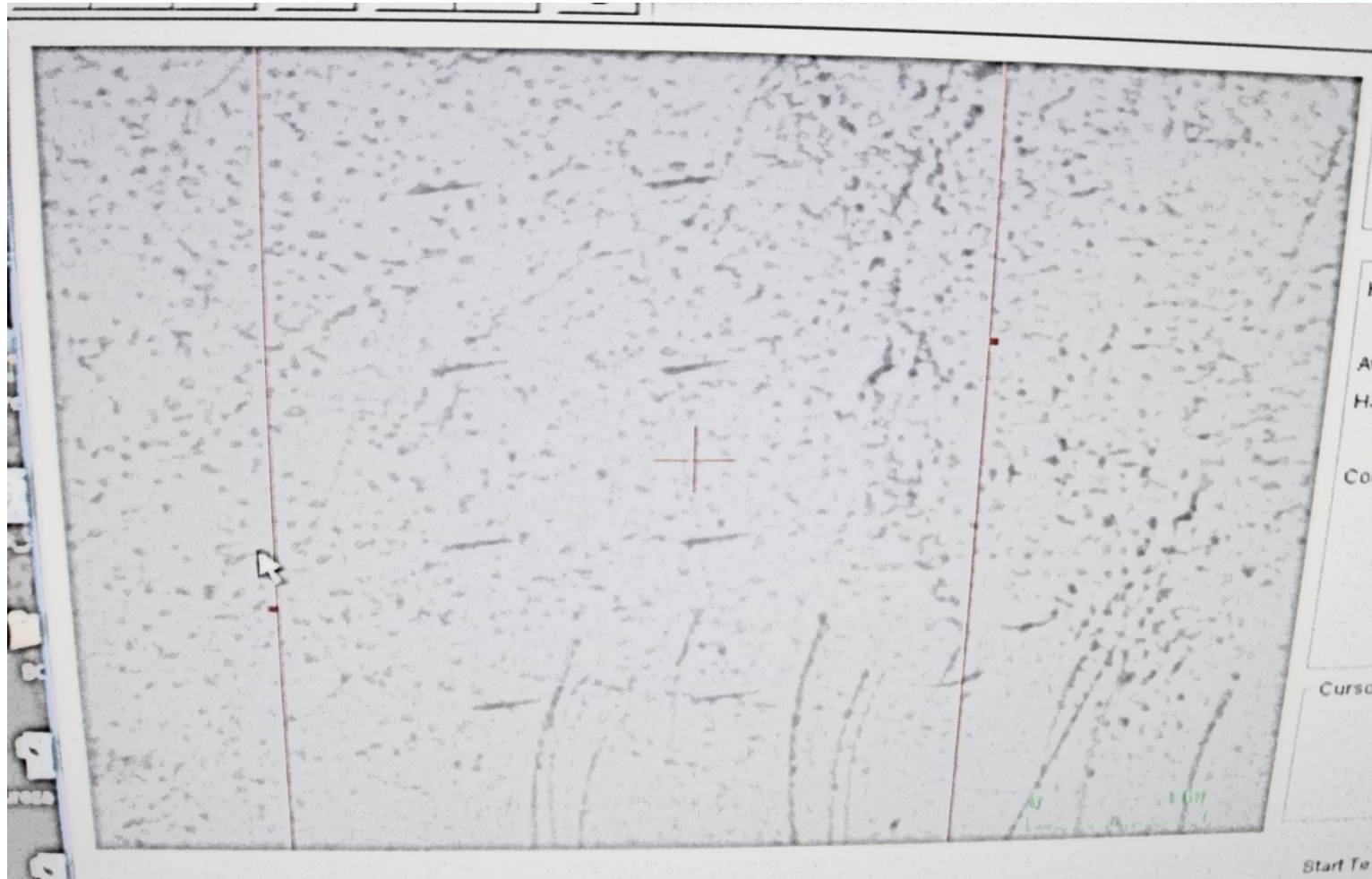
# DISEÑO PARA OBTENCIÓN DE MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE FINAL



**Figura : Forma de realizar las indentaciones después de la irradiación de las muestras para la obtención de los valores finales de dureza.**

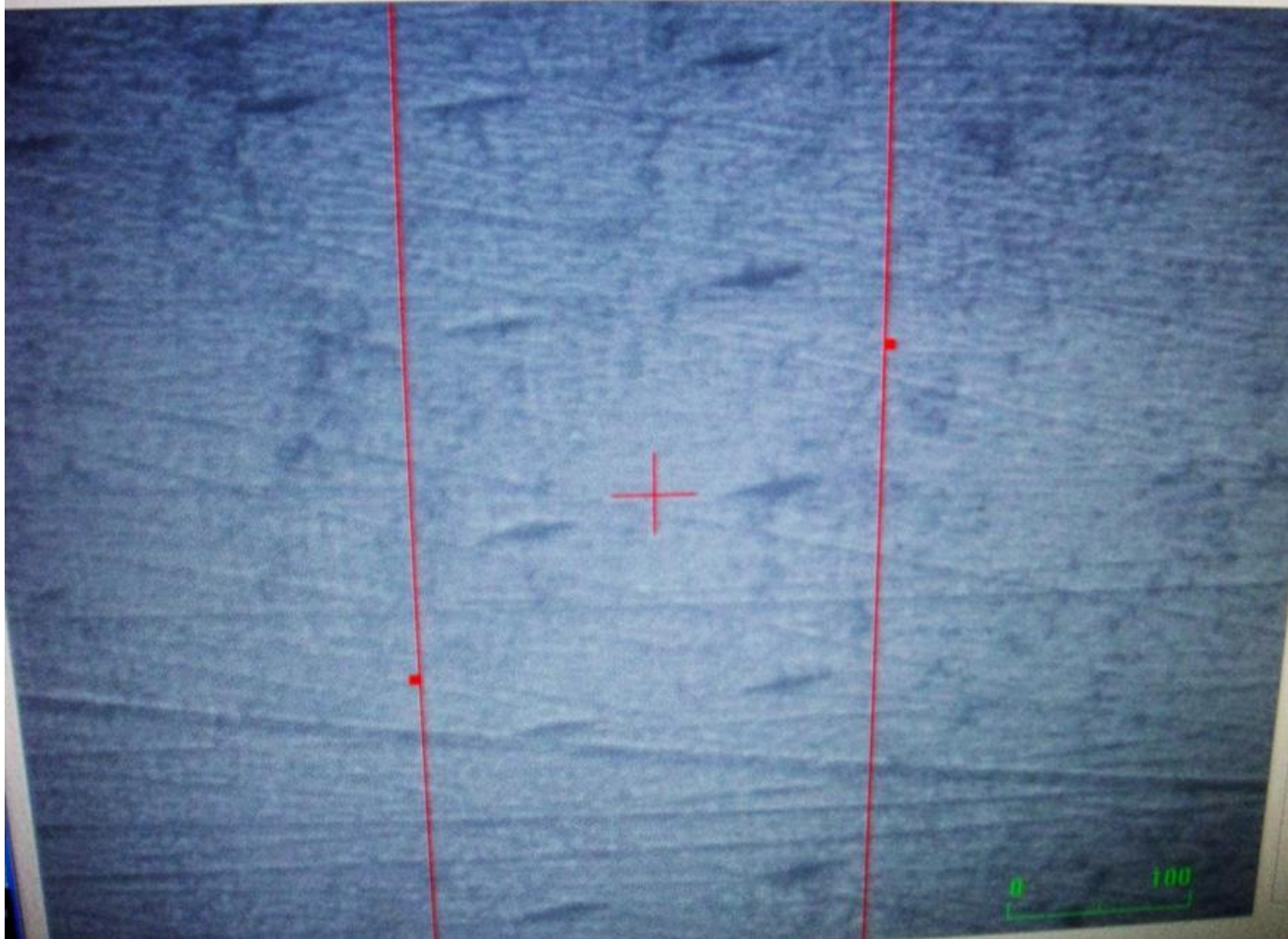
(Fonte: ZAMATARO CB, et al. 2013.)

# ANÁLISIS DE MICRODUREZA FINAL ( INDENTADOR KNOOP)



**Análisis de microdureza de superficie final em las muestras de esmalte dentário**

# ANÁLISE DE MICRODUREZA FINAL (INDENTADOR KNOOP)



**Análisis de la microdureza de superficie final en las muestras de dentina radicular**

# PROTOCOLO DE MICRODUREZA FINAL (% DE PÉRDIDA)

- A partir del borde seleccionado para la microdureza inicial —→ Protocolo inicial descrito
- Distancia —→ 200 μm de las indentaciones iniciales
- Volume mineral perdido segundo fórmula:

**% Variación de la dureza de superficie =  $\frac{\text{MDS inicial} - \text{MDS após tratamiento}}{\text{MDS Inicial}} \times 100$**

\*MDS: microdureza de superficie

# ANÁLISIS DIRECTO POR MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO DE BARREDURA (MEB)

I. Antes/después de la radiación gama para o grupo de osso mandibular

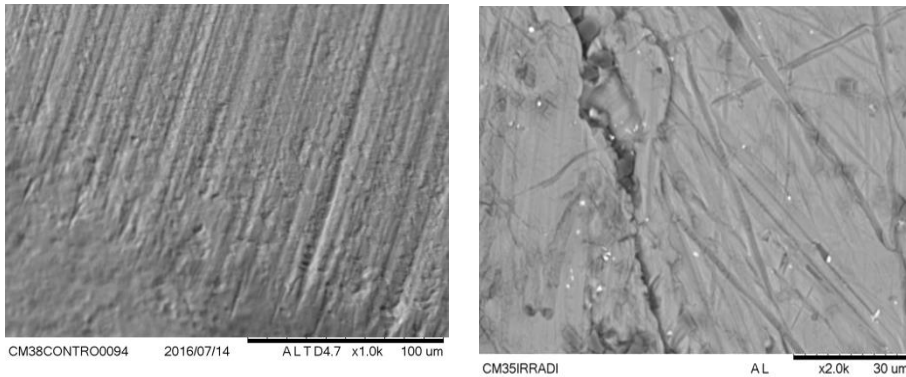


Fig.1 e 2 Imágenes antes y después de la irradiación en las muestras del cuerpo mandibular

II. Después de una dosis total de 72 Gy para el grupo de esmalte y dentina

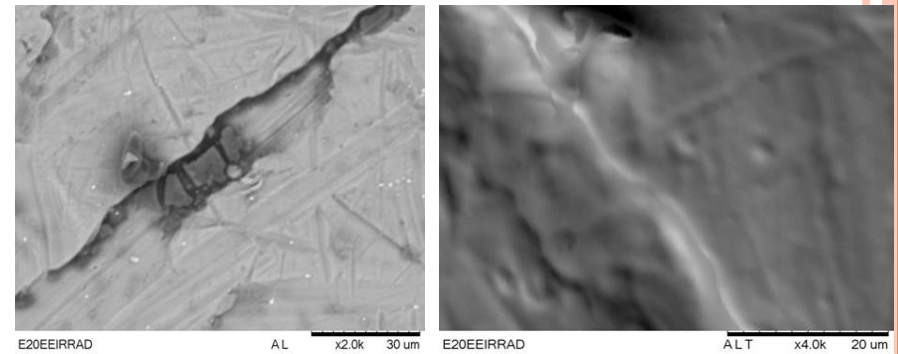


Fig. 4 e 5 Imágenes después de la irradiación gama de las muestras de esmalte dentario (2000x e 4000x)

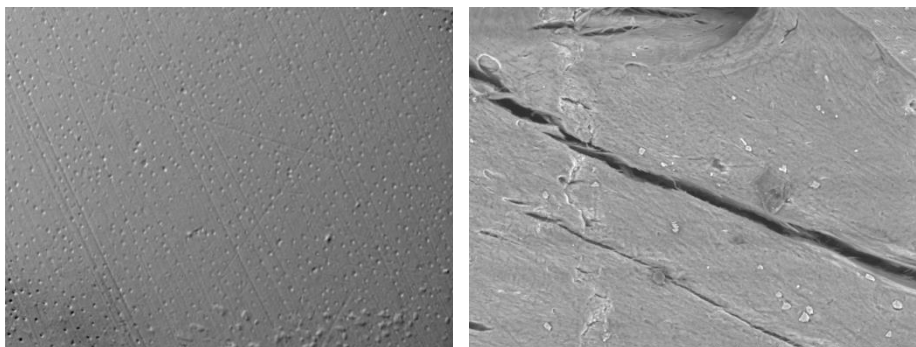


Fig. 3 e 4 Imágenes antes y después de la irradiación gama en las muestras de la región del trigono retromolar

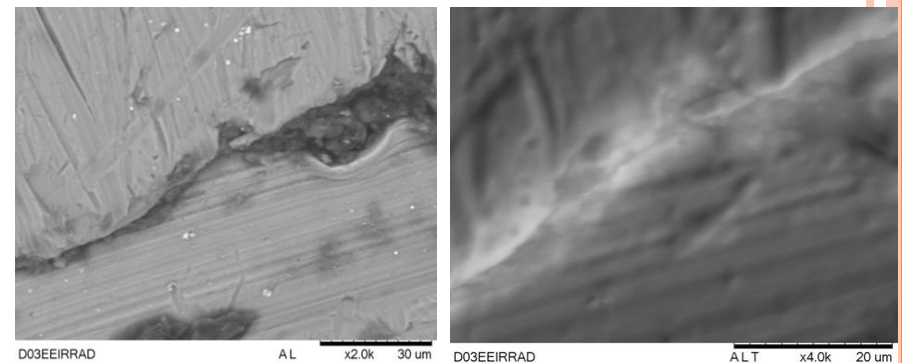


Fig. 6 e 7 Imágenes antes y después de la irradiación gama de las muestras de dentina radicular (2000x e 4000x)

# ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE *FOURIER* – REFLEXIÓN TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR)

## I. FUNDAMENTOS

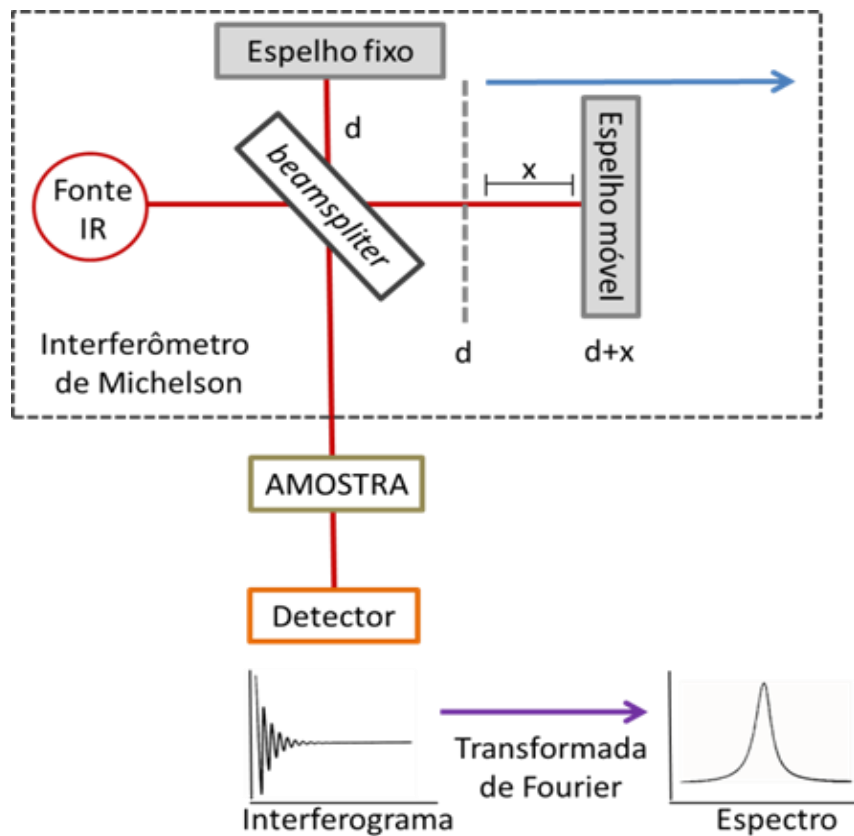


Fig. 5. 2 Esquema que mostra os componentes e o funcionamento do interferômetro de *Michelson* e a forma da Transformada de *Fourier* de gerar o espectro

## II. ANÁLISIS PROPIAMENTE DICHA

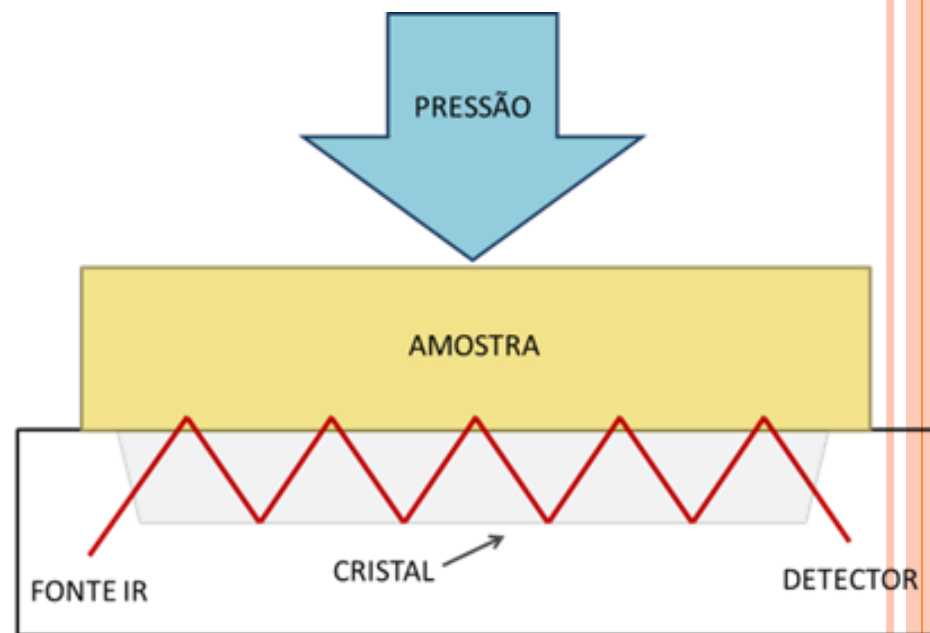
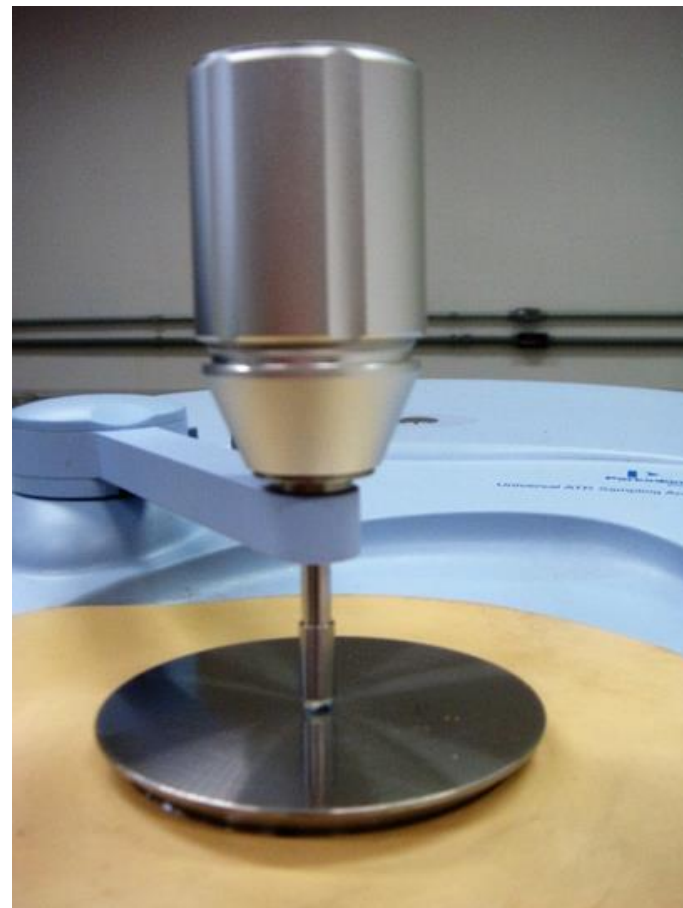


Fig. 5. 3 Representação da interação do equipamento ATR-FTIR com a amostra a ser analisada.

# ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR ATR-FTIR



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

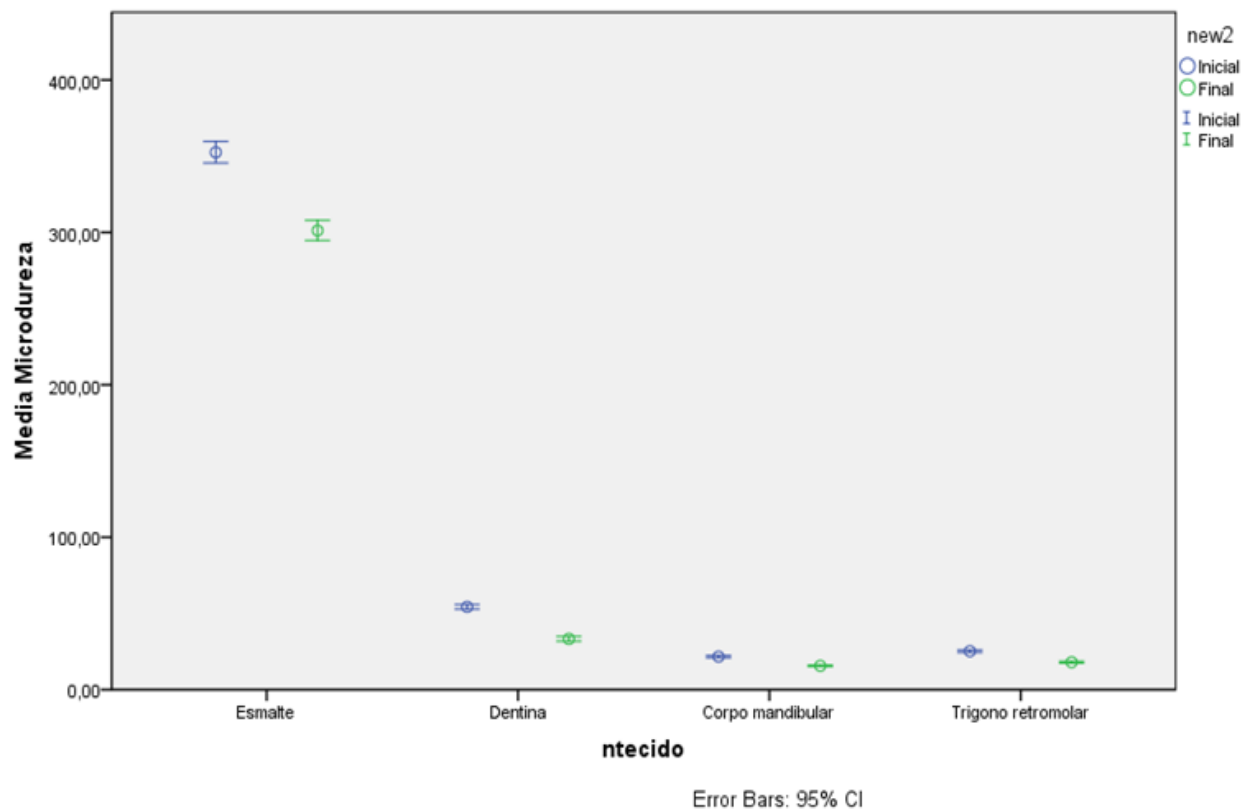


**Fig. 4. 7. 8 Análise por reflexão total atenuada das amostras em estudo, com a aplicação de uma força de pressão de 130 N**

# RESULTADOS - ANÁLISIS ESTADÍSTICA

(TEST ESTADÍSTICO *T DE STUDENT*, IC: 95%)

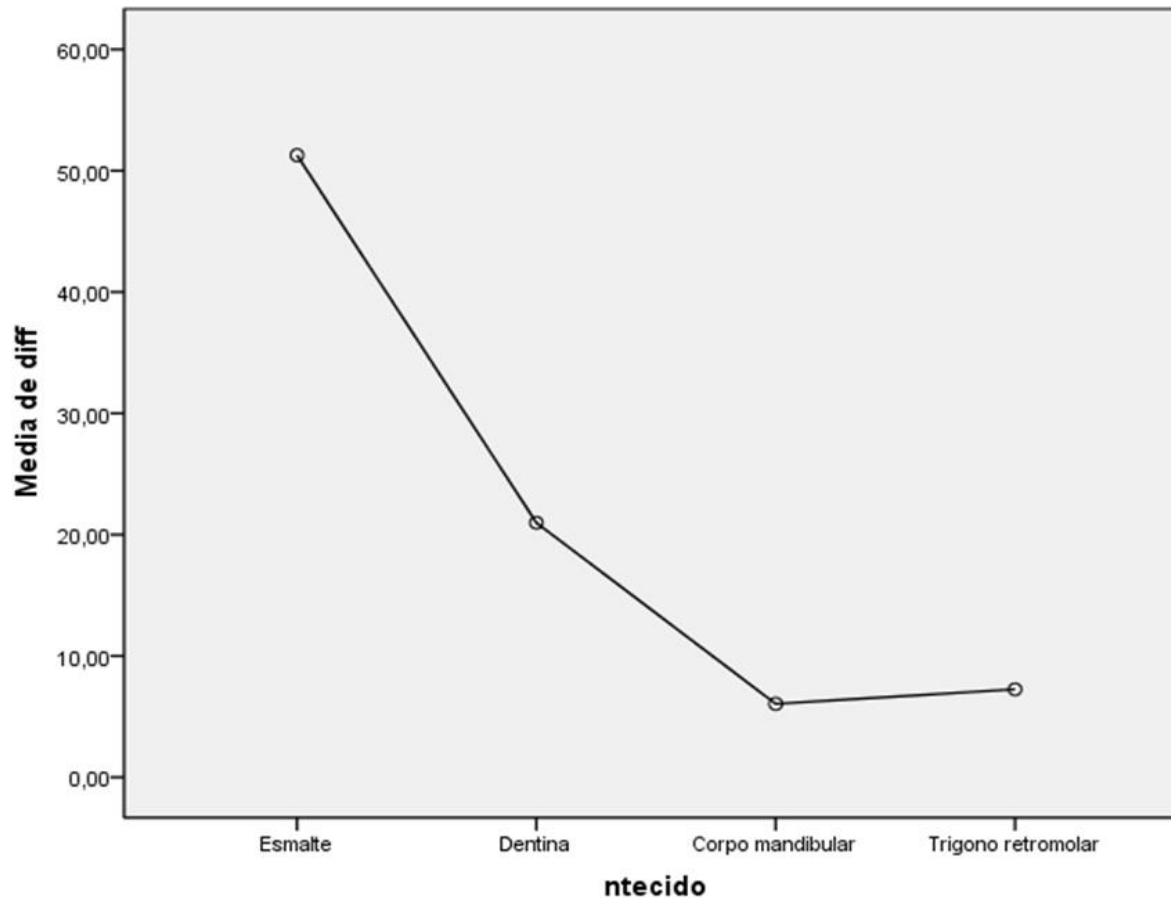
Gráfico 1.1: Esquema representativo del test de *t de student* para análisis de los valores del promedio e desvio padrão de los valores de microdureza inicial e final de las muestras en estudio



# RESULTADOS : ANÁLISIS ESTADÍSTICA

(TEST DE ANOVA, *TUKEY*, IC: 95%)

Gráfico 1. 2. Promédio de las diferencias de los valores de microdureza de superficie de los grupos en estudio



# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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>
- 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)
- 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
- 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.
- 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.* Vol76(7):704-13 , 2013.
- 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.
- 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
- 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.
- 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)*.
- KOULOURIDES T. Dynamics of tooth surface-oral fluid equilibrium. *Adv Oral Biol.* Vol. 2:149-71, 1966.
- KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. Curso Introdutório de Microscopia Eletrônica de Varredura, 2ª Edição. NAP/MEPA, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.* 47° Edicao: 1-13, 2014.
- 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.
- 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
- PING Q., HUANG S., SHANSHAN G., et al. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth enamel. *Nature, Scientific Reports.* 2015
- 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
- VISSINK A., et al. Oral Sequelae of Head and Neck Radiotherapy. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14(3):199-212, 2003.
- 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.
- TRENTO C.L. Densitometria óssea em mandíbula de suínos submetidos a enxerto ósseo autógeno, homogêneo e heterógeno. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2006.
- 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
- 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
- BROSH T., ROZITSKY D., GERON S., et al. Tensile Mechanical Properties of Swine Cortical Mandibular Bone. *PLOS ONE.* 2014
- 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
- PEARCE AI., RICHARD RG., MILZ S., et al. Animal Models for implant biomaterial research bone: A review. 13: 1-10, 2007.
- 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
- 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
- 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
- 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

**MUCHAS GRACIAS!!!**

**Contato: [ebernaola@usp.br](mailto:ebernaola@usp.br)**

