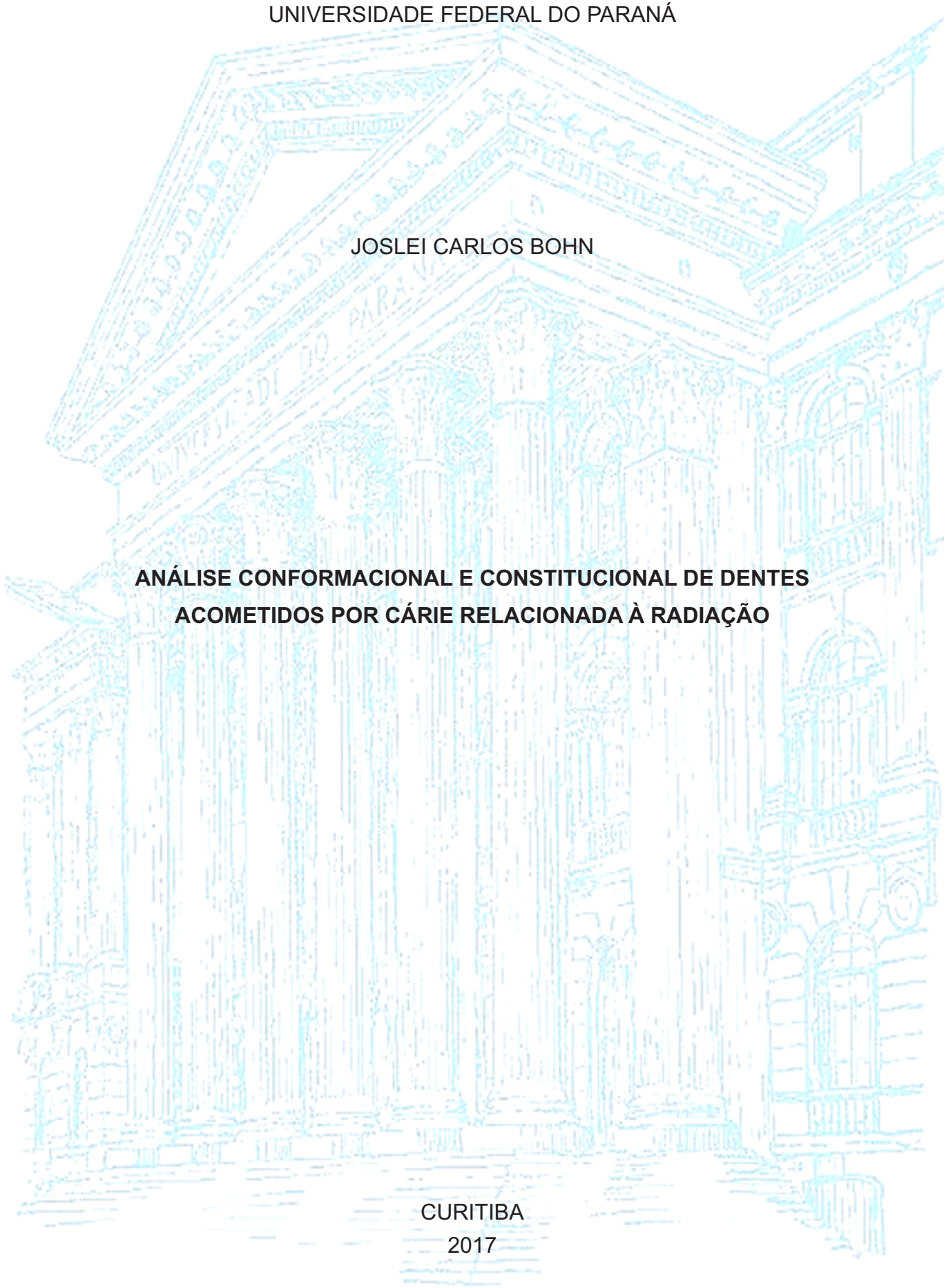


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSLEI CARLOS BOHN

**ANÁLISE CONFORMACIONAL E CONSTITUCIONAL DE DENTES
ACOMETIDOS POR CÁRIE RELACIONADA À RADIAÇÃO**

CURITIBA
2017



JOSLEI CARLOS BOHN

**ANÁLISE CONFORMACIONAL E CONSTITUCIONAL DE DENTES
ACOMETIDOS POR CÁRIE RELACIONADA À RADIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima

CURITIBA
2017

Bohn, Joslei Carlos

Análise conformacional e constitucional de dentes acometidos por cárie relacionada à radiação / Joslei Carlos Bohn – Curitiba, 2017.

63 f. ; il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Cárie dentária. 2. Radioterapia. 3. Tomografia computadorizada.
4. Microscopia eletrônica. I. Lima, Antonio Adilson Soares de.
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.67

TERMO DE APROVAÇÃO

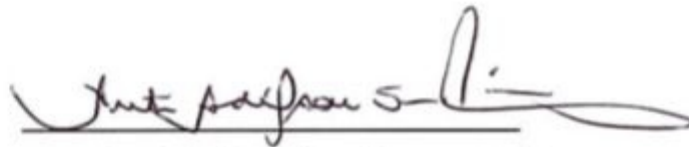
JOSLEI CARLOS BOHN

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

**ANÁLISE CONFORMACIONAL E CONSTITUCIONAL DE DENTES ACOMETIDOS
POR CÁRIE RELACIONADA À RADIAÇÃO**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador:



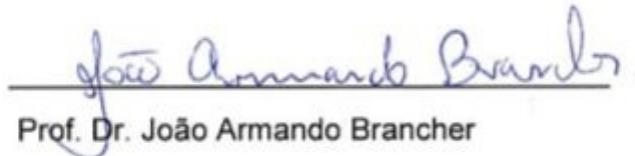
Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR



Profa. Dra. Ângela Fernandes

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR



Prof. Dr. João Armando Brancher

Centro de Ciências Biológicas da Saúde, PUCPR

Curitiba, 28 julho de 2017.

Dedico a Deus, por sua onipresença e seu amor incondicional por todas suas criações, sem as quais não haveria razão de existirmos.

Aos meus pais, que sempre lutaram por nossa educação e saúde, e dão o máximo de si para nos verem felizes.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a meus pais pelo apoio à distância, mesmo sem saber o motivo de tanto estudo e até sem entender o que é este trabalho.

À minha irmã Giselle que, também tão distante, me apoia nesta árdua batalha que é a vida acadêmica e me incentiva a buscar sempre mais.

Ao professor e orientador Dr. Antonio Adilson Soares de Lima, que aceitou o desafio de uma orientação num tema um pouco aquém de sua rotina, mas que o fez de maneira exemplar e sempre esteve disponível quando necessário. Pela sua paciência durante as turbulências, pela cobrança sempre nos momentos certos e principalmente pelo incentivo à carreira docente.

Aos professores do mestrado e da graduação em Odontologia, Dra. Ângela Fernandes, Dr. José Miguel Amenábar Céspedes e Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira por, além de seu conhecimento e experiência, suas dicas e ajuda em todos os momentos nesses anos de faculdade. Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPR pelo compartilhamento de suas experiências e pela disponibilidade em querer nos ajudar, além do desejo em nos ver como Mestres.

Ao Laboratório de Análise de Minerais e Rochas da UFPR e em especial à Profa. Dra. Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger, pela disponibilidade irrestrita deste moderno laboratório, e ainda aos técnicos Thiago Gomes da Silva e Leandro Keiji Maurer Ozahata, que disponibilizaram seus tempos e muita vontade em fazer com que este trabalho pudesse começar a tomar forma.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR que nos acolheu durante várias noites e ao técnico Deonir Agustini, que com muita paciência disponibilizou várias e várias horas do seu tempo para as intermináveis análises microscópicas, sem as quais esse trabalho não teria tomado às proporções que tomou e não teria a qualidade gráfica que pudemos vislumbrar.

À cirurgiã-dentista Suzana Soares de Souza, do Hospital Dr. Luiz Antônio da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer, pelo inestimável apoio para seleção dos dentes com cárie relacionada à radiação, sem os quais este trabalho não existiria.

Ao eterno amigo e “irmão”, Dr. Cassiano Lima Chaiben, por sua grande ajuda e disponibilidade durante todos esses anos, desde a graduação. Além disso, por seu companheirismo e amizade que ultrapassa os limites acadêmicos e profissionais. Aproveito aqui, para agradecer também a sua esposa, Dra. Viviane Bernardes de Oliveira Chaiben, pela amizade e por abrir as portas de seu lar, sempre que necessário!

À secretária do PPGO, Ana Maristela Rodaki e à bióloga do Laboratório de Patologia Odontológica da UFPR, Bruna Colombo Cordeiro, pela companhia durante essa jornada, pelas horas de descontração e pelo apoio nas situações mais complicadas.

Ao Professor Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura, pela sua sempre disponibilidade em auxiliar e discutir os trabalhos de pesquisa, mesmo de tão longe, e ainda mais por fazer parte da banca de qualificação.

Às colegas de mestrado e amigas, Larissa Balbo Zavarez e Isabella Eloy de Souza Barbaresco Damiani, por sua ajuda e companheirismo durante esses instigantes anos de pós-graduação e principalmente pelo ombro amigo nos momentos tortuosos. Aos demais colegas de Mestrado, que juntos ajudaram a cumprir mais uma etapa, de muitas que estão por vir.

Ao projeto de extensão Boca Aberta coordenado pelo Professor Adilson, que possibilitou uma grande interação prática, com os discentes participantes e com as comunidades hospitalares externas à Universidade.

Aos discentes de graduação e funcionários da UFPR, que contribuíram de alguma maneira para que o sonho de ser professor seja possível.

Por fim, agradeço à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, órgão que fomenta o programa de pós-graduação e permite que os estudantes possam ter ensino de qualidade e acesso ao mundo científico.

RESUMO

A cárie relacionada à radiação (CRR) ionizante é uma forma agressiva e progressiva de cárie dentária. Clinicamente, ela se apresenta como lesões acastanhadas na região cervical dos dentes em pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de tumores de cabeça e pescoço. Sua causa ainda é um contrassenso na literatura e tem sido objetivo de vários estudos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a morfologia e a composição química de lesões de CRR. Vinte e quatro dentes humanos foram divididos em três grupos: G1CR (8 dentes com CRR), G2CC (8 dentes com cárie dentária convencional) e G3HG (8 dentes hígidos). Inicialmente, os dentes foram analisados quanto aos seus aspectos macroscópicos. Em seguida, foram submetidos às seguintes técnicas para avaliação da morfologia: radiografia periapical, tomografia computadorizada, microtomografia computadorizada e microscopia eletrônica de varredura (rugosidade e topografia). A composição química foi avaliada por meio da espectroscopia dispersiva de raios-X. Os resultados demonstraram que existe mais desmineralização nas lesões de CRR se comparado às cáries dentárias convencionais, mesmo não havendo cavitação na região cervical dos dentes. A rugosidade superficial e a topografia da CRR foram semelhantes àquelas dos dentes hígidos. Por outro lado, as lesões de cáries dentárias convencionais se apresentaram com maior irregularidade superficial e topográfica quando comparadas às CRR e aos dentes hígidos ($p = 0,001$). A análise da composição química revelou que houve uma redução significativa da quantidade de cálcio e fósforo entre os três grupos e aumento na quantidade de carbono. A média de cálcio foi menor em G1CR ($13,72 \pm 4,22 \mu\text{m}$) quando comparada a G2CC ($18,77 \pm 2,47$) e a G3HG ($22,87 \pm 1,38 \mu\text{m}$). A média de fósforo foi menor em G1CR ($6,77 \pm 2,02 \mu\text{m}$) quando comparada a G2CC ($9,47 \pm 1,43$) e a G3HG ($11,72 \pm 0,47 \mu\text{m}$). A média de carbono foi maior nos dentes com CRR ($42,37 \pm 7,80 \mu\text{m}$), menor àqueles com CC ($32,99 \pm 4,38 \mu\text{m}$) e menor ainda em dentes hígidos ($25,28 \pm 1,84 \mu\text{m}$). A redução significativa da matriz mineral (Ca e P) foi condizente com os achados nos exames de imagem, pois houve uma maior perda nos dentes com cárie de radiação e levemente menor nos dentes com cárie convencional quando comparados aos dentes hígidos. Baseado nesses achados pode-se concluir que a CRR, apesar da sua evolução rápida, apresenta uma superfície irregular aparentemente íntegra com mudanças significativas na quantidade de Ca, P e C.

Palavras-chave: Cárie dentária. Radioterapia. Tomografia computadorizada. Microtomografia computadorizada. Microscopia eletrônica. Espectroscopia.

ABSTRACT

Radiation-related caries (RRC) is an aggressive and progressive form of dental caries. Clinically, it presents the brownish lesions in the cervical region of teeth in patients submitted to radiotherapy for head and neck tumors treatment. Often RRC does not present cavitation, which leads the dentist not to give due importance of its severity. The aim of this study was to assess the morphology and chemical composition of RRC lesions. Twenty-four human teeth were divided into three groups: G1CR (8 teeth with RRC), G2CC (8 teeth with conventional tooth decay) and G3HG (8 sound teeth). Initially, the teeth were analyzed for macroscopic findings. Then, they were carried for evaluation of morphology using the following techniques: periapical radiography, computerized tomography, computerized microtomography and scanning electron microscopy (roughness and topography). Chemical composition was evaluated by energy dispersive spectroscopy of X-ray. The results showed that there was more demineralization in RRC lesions when compared to conventional dental caries, even if there was no cavitation in cervical region of teeth. Surface roughness and topography of RRC were similar to those of sound teeth. On the other hand, conventional dental caries lesions presented greater superficial and topographic irregularity when compared to RRC and healthy teeth ($p = 0.001$). An analysis of the chemical composition revealed a significant reduction of the amount of calcium and phosphorus between the three groups and increase in the amount of carbon. Mean of calcium was lower in G1CR ($13.72 \pm 4.22 \mu\text{m}$) when compared to G2CC (18.77 ± 2.47) and G3HG ($22.87 \pm 1.38 \mu\text{m}$). Mean of phosphorus was lower in G1CR ($6.77 \pm 2.02 \mu\text{m}$) when compared to G2CC (9.47 ± 1.43) and G3HG ($11.72 \pm 0.47 \mu\text{m}$). Mean of carbon was higher in CRR teeth ($42.37 \pm 7.80 \mu\text{m}$), lower in those with SC ($32.99 \pm 4.38 \mu\text{m}$) and lower in healthy teeth ($25.28 \pm 1.84 \mu\text{m}$). A significant reduction of the mineral matrix (Ca and P) was consistent to the findings in the imaging tests, as there was a greater loss in teeth with RRC and slightly lower in the teeth with conventional tooth decay when compared to the sound teeth. According to the findings and despite its rapid evolution, it can be concluded that RRC presents an apparently intact surface with significant changes in amount of Ca, P and C.

Keywords: Dental caries. Radiotherapy. Computed tomography. Computerized Microtomography. Scanning electron microscopy. Spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático para preparação das amostras para análise ao microscópio eletrônica de varredura	40
Figura 2 - Região de eleição para EDX	40
Figura 3 - Morfologia dos dentes avaliados	41
Figura 4 - Imagens da superfície dentinária em microscopia eletrônica de varredura	42
Figura 5 - Imagens da superfície dentinária em microscopia eletrônica de varredura	43
Figura 6 - Projeção tridimensional de topografia superficial por meio do microscópio eletrônica de varredura	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos pacientes submetidos a tratamento radioterápico	37
Tabela 2 - Pareamento dos dentes.	37
Tabela 3 - Índice Dentário Pós-Radioterapia	38
Tabela 4 - Análise de rugosidade superficial	38
Tabela 5 - Análise estatística de rugosidade superficial.	38
Tabela 6 - Análise de topografia superficial	39
Tabela 7 - Análise estatística de topografia superficial.	39
Tabela 8 - Constituição química e taxas entre elementos químicos.	39
Tabela 9 - Análise estatística de constituição química	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 ARTIGO	16
3.1 CONFLITOS DE INTERESSE	17
3.2 RESUMO	18
3.3 INTRODUÇÃO	19
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.5 RESULTADOS	27
3.6 DISCUSSÃO	30
3.7 AGRADECIMENTOS	34
3.8 LEGENDAS	35
3.9 TABELAS	37
3.10 ILUSTRAÇÕES	40
3.11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
4 CONCLUSÕES	48
5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
6 ANEXOS	52
6.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	52
6.2 NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO	56

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o último relatório do Instituto Nacional do Câncer (INCA, Brasil), a estimativa de novos casos de câncer em região de cabeça e pescoço para 2017 era de 29.800 indivíduos, sendo 15.490 casos em cavidade oral (INCA, 2016). A radioterapia (RT) é uma modalidade utilizada para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço (SILVA e ARRUDA, 2004). Ela emprega radiações ionizantes com o objetivo de destruir células neoplásicas, visando obter redução ou desaparecimento da lesão maligna (LIMA *et al.*, 2001).

As radiações ionizantes agem sobre o DNA levando à morte celular ou à perda da sua capacidade reprodutiva. Como o conteúdo de DNA duplica durante a mitose, as células com alto grau de atividade mitótica são mais radiosensíveis se comparado àquelas com baixa taxa de mitose. A ação da radiação pode ser direta ou indireta. Na ação direta, a molécula de DNA é clivada, o que interfere no processo de duplicação. No efeito indireto, a água é dissociada em dois radicais, hidrogênio (H⁺) e hidroxila (OH⁻), sendo que este último reage com as bases de DNA, interferindo no processo de duplicação. Como a água representa a maior parte do conteúdo celular, o efeito indireto é proporcionalmente mais deletério do que o direto (MURAD e KATZ, 1996).

Os efeitos clínicos agudos ou tardios da terapia antineoplásica sobre as estruturas bucais variam desde hipossalivação, trismo, fibrose, mucosite, cárie relacionada à radiação (CRR), doença periodontal, perda do paladar e osteorradionecrose (WALKER *et al.*, 2011; EPSTEIN *et al.*, 2012). Essas complicações costumam ser subestimadas e impactam a qualidade de vida dos pacientes (EPSTEIN *et al.*, 2012; SCHWEYEN *et al.*, 2012; LIESHOUT e BOTS, 2014).

Em uma revisão sistemática, Lieshout e Bots (2014) concluíram que a radiação ionizante produz efeitos diretos nas estruturas dentárias e na produção de saliva, diminuindo o fluxo salivar (hipossalivação) e modificando sua qualidade (mais mucosa e menos serosa). Além do efeito direto da radiação sobre as glândulas salivares, a diminuição da capacidade tampão (EPSTEIN *et al.*, 2012), mudanças na dieta, alteração da microbiota bucal e má higienização podem ser considerados os fatores etiológicos mais importantes no processo de desmineralização dentária (KIELBASSA *et al.*, 2000). Essas complicações podem

ser considerados os fatores etiológicos mais importantes no processo de desmineralização dentária (KIELBASSA *et al.*, 2000). Essas complicações podem ser diminuídas com o estabelecimento de um protocolo pré e trans-radioterapia de higienização bucal (SASSI e MACHADO, 2009; SCHWEYEN *et al.*, 2012).

A dentina, estrutura mineralizada mais envolvida nos casos de CRR (KIELBASSA *et al.*, 2000), está localizada sob o esmalte dentário. É visível à região cervical quando o dente fora acometido por algum tipo de desgaste (mecânico ou fisiológico) ou quando o tecido periodontal de proteção não está mais presente. Ela é um composto biológico de três fases: uma mineral, hidroxiapatita, cuja fórmula química é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$; uma orgânica, fibras colágenas; e outra fluída, composta basicamente de água (ZELIC *et al.*, 2014).

O avanço de desmineralização das estruturas dentárias, sobretudo a dentina, leva à CRR, uma forma altamente destrutiva e progressiva de cárie dentária (KIELBASSA *et al.*, 2000). Em geral, a CRR tem o seu início na região cervical da face vestibular dos dentes, podendo se estender para faces mesial e distal. Em muitos casos, a CRR apresenta-se como uma coloração marrom difusa na região cervical dos dentes, mesmo em estruturas não cavitadas e superfície lisa (MOTA *et al.*, 2013; MORAIS-FARIA *et al.*, 2016). As lesões da CRR aumentam a fragilidade do esmalte e da estrutura dentária como um todo, culminando muitas vezes em sua amputação coronária (KIELBASSA *et al.*, 2000; SPRINGER *et al.*, 2005; MOTA *et al.*, 2013; LIESHOUT e BOTS, 2014). Em alguns casos, cerca de 30%, ela pode acometer as pontas de cúspides de dentes posteriores e borda incisal dos dentes anteriores (BEECH *et al.*, 2014).

Alguns pacientes podem desenvolver a CRR em dentes não expostos à radiação, ocorrendo mesmo em locais onde não são identificadas as lesões de cárie convencional (CC) (BEECH *et al.*, 2014).

A causa real que leva à CRR ainda é incerta e de contrassenso na literatura (LIESHOUT e BOTS, 2014; DENG *et al.*, 2015; GOMES-SILVA *et al.*, 2017). Apesar disso, acredita-se que as radiações empregadas pela radioterapia possam exercer efeitos na estrutura dentária, incluindo mudanças de microdureza e alterações na morfologia microscópica do esmalte e da dentina (KIELBASSA *et al.*, 2000; HONG *et al.*, 2010; MOTA *et al.*, 2013; DENG *et al.*, 2015). Estima-se que 25% dos pacientes com câncer de cavidade oral, e que sejam submetidos à RT, possam ser acometidos pela CRR (HONG *et al.*, 2010).

As lesões de CRR são tratadas por procedimentos restauradores convencionais. As extrações de dentes acometidos pela CRR são contraindicadas, devido principalmente à possibilidade de desenvolvimento da osteorradionecrose. Entretanto, em casos em que tal procedimento é inevitável, deve ser empregada uma técnica minimamente traumática e com previsão de reparação por primeira intenção (BEECH *et al.*, 2014).

Poucos estudos procuraram investigar os parâmetros clínicos e radiográficos da CRR (MORAIS-FARIA *et al.*, 2016). Silva *et al.* (2009) analisaram 36 dentes extraídos por razões periodontais de pacientes que haviam sido submetidos a doses acima de 50 Gy para tratamento de câncer de cabeça e pescoço. Além da avaliação macroscópica e radiográfica das lesões, de superfícies lisas e com aspecto marrom-difuso, foram utilizados um microscópio de luz polarizada e um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Com auxílio destas técnicas, os autores identificaram as zonas de cárie dentinária e os padrões de desmineralização das lesões de cárie. Outro achado observado foi a presença de trincas e fraturas, tanto em esmalte quanto em dentina. Este fato provavelmente foi devido ao preparo das amostras e não à progressão da doença, assim como já descrito em estudos anteriores. Desta forma, os autores concluíram que as lesões de cárie observadas nos pacientes submetidos à radioterapia apresentam um grau de desmineralização acentuado e que é subestimado pelos clínicos. Além disso, as características encontradas explicam a progressão da CRR.

Mota *et al.* (2013) verificaram a desorganização estrutural e perda de matriz mineralizada na área da junção amelo-dentinária (JAD), além de perda de cimento naquela região. Os autores também puderam observar uma separação do esmalte e dentina (“delaminação”) próxima à JAD, mesmo na estrutura mineral aparentemente saudável. Eles demonstraram essas alterações na região cervical de 36 dentes com CRR. Nesse trabalho, a estrutura morfológica de cada órgão foi avaliada por meio de tomografia de coerência óptica, observando microestruturas de até 100 µm.

Morais-Faria *et al.* (2016) analisaram 10 dentes com CRR por meio de microtomografia computadorizada. Os autores demonstraram o extenso padrão radiográfico de desmineralização na região cervical dos dentes, mesmo naqueles casos em que não havia cavitação na avaliação clínica, mas apenas uma

coloração marrom difusa. O estudo concluiu que a CRR é mais destrutiva do que aparenta ser.

Apesar da avaliação das CRR por meio de imagens ser eficaz para se determinar o grau de comprometimento das lesões, outros métodos podem ainda ser utilizados (SILVA *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2013; MORAIS-FARIA *et al.*, 2016). Arnold *et al.* (2003 e 2007) avaliaram CC em região radicular com um espectroscópio de energia dispersiva de raios-X (EDX) acoplado a um MEV. Foram encontrados valores significativamente diminuídos de cálcio (Ca) e fósforo (P) em locais onde havia dentina desmineralizada quando comparado a áreas de dentina sadia.

Diante do exposto, este trabalho objetivou a avaliação conformacional e constitucional de dentes com CRR, comparando-os a dentes com CC e a dentes hígidos. Para tais análises, foram utilizados métodos de radiografia periapical convencional, tomografia computadorizada de feixe cônico, microtomografia computadorizada, microscópio eletrônico de varredura e espectroscópio de energia dispersiva de raios-X.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a morfologia e a composição química das lesões da estrutura dentária dos dentes com cárie relacionada à radiação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar lesões de cáries relacionadas à radiação e comparar com cáries dentárias convencionais e dentes hígidos por meio de radiografia periapical convencional, tomografia computadorizada de feixe cônico, microtomografia computadorizada, microscópio eletrônico de varredura e espectroscópio de energia dispersiva de raios-X.

3 ARTIGO

Título: ANÁLISE CONFORMACIONAL E CONSTITUCIONAL DE DENTES ACOMETIDOS POR CÁRIE RELACIONADA À RADIAÇÃO.

Título curto: MORFOLOGIA DE LESÕES DE CÁRIE RELACIONADA À RADIAÇÃO

Joslei Carlos Bohn, JCB¹

Cassiano Lima Chaiben, CLC²

Suzana Soares de Souza, SSS³

Regiane Benez Bixofis Maluf, RBBM⁴

Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger, AMBR⁵

Ângela Fernandes, Af¹

Antonio Adilson Soares de Lima, AASL¹

¹ Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

² Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

³ Hospital Dr. Luiz Antônio, Liga Norte Riograndense Contra o Câncer, Natal, RN, Brasil.

⁴ Cirurgiã Dentista, Toronto, ON, Canadá.

⁵ Departamento de Geologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Palavras-chave: Cárie dentária; Radioterapia; Tomografia computadorizada; Microtomografia computadorizada; Microscopia eletrônica; Espectroscopia.

Autor para correspondência

Joslei Carlos Bohn

Programa de Pós-Graduação em Odontologia UFPR

Rua Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico

81210-170 - Curitiba/PR - Brasil

Telefone: +55 41 3360-4026

E-mail: josleibohn@gmail.com

3.1 CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse durante a realização desta pesquisa, tampouco não terem sido contemplados por quaisquer formas de fomento.

3.2 RESUMO

A cárie relacionada à radiação (CRR) ionizante é uma forma agressiva e progressiva de destruição dentária. Este estudo avaliou a morfologia e a composição química de lesões de CRR. Vinte e quatro dentes humanos foram divididos em três grupos e, inicialmente, analisados quanto aos seus aspectos macroscópicos. Em seguida, foram submetidos às seguintes técnicas para avaliação da morfologia: radiografia periapical, tomografia computadorizada, microtomografia computadorizada e microscopia eletrônica de varredura (rugosidade e topografia). A composição química foi avaliada por meio da espectroscopia dispersiva de raios-X. Os resultados demonstraram que existe mais desmineralização nas lesões de CRR se comparadas às cáries dentárias convencionais, mesmo não havendo cavitação na região cervical dos dentes. A rugosidade superficial e a topografia da CRR foram semelhantes àsquelas dos dentes hígidos. Por outro lado, as lesões de cáries dentárias convencionais se apresentaram com maior irregularidade superficial e topográfica quando comparadas às CRR e aos dentes hígidos ($p=0,001$). A análise da composição química revelou que houve uma redução significativa da quantidade de cálcio e fósforo entre os três grupos e aumento na quantidade de carbono. A redução significativa da matriz mineral (Ca e P) foi condizente com os achados nos exames de imagem, pois houve uma maior perda nos dentes com cárie de radiação e levemente menor nos dentes com cárie convencional quando comparados aos dentes hígidos. Baseado nestes achados pode-se concluir que a CRR, apesar da sua evolução rápida, apresenta uma superfície irregular aparentemente íntegra com mudanças significativas na quantidade de Ca, P e C.

3.3 INTRODUÇÃO

A radioterapia (RT) é uma modalidade de tratamento do câncer de cabeça e pescoço que emprega radiações ionizantes com o objetivo de destruir células neoplásicas [Lima *et al.*, 2001; Silva e Arruda, 2004]. Seus efeitos nas estruturas bucais variam desde hipossalivação, trismo, fibrose, mucosite, cárie relacionada à radiação (CRR), doença periodontal e osteorradionecrose [Walker *et al.*, 2011; Epstein *et al.*, 2012]. Essas complicações costumam ser subestimadas e impactam na qualidade de vida dos pacientes [Epstein *et al.*, 2012; Schweyen *et al.*, 2012; Lieshout e Bots, 2014].

A radiação ionizante produz efeitos diretos nas estruturas dentárias e nas glândulas salivares [Epstein *et al.*, 2012]. Os efeitos nessas glândulas repercutem na produção de saliva, diminuindo o fluxo salivar (hipossalivação) e modificando a sua qualidade [Lieshout e Bots, 2014].

A dentina é a estrutura dental mineralizada mais envolvida nos casos de CRR [Kielbassa *et al.*, 2000]. Ela é composta por hidroxiapatita (fase mineral), cuja fórmula química é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, por proteínas (fase orgânica), e água (fase fluída) [Zelic *et al.*, 2014]. O avanço exacerbado de desmineralização das estruturas dentárias, sobretudo a dentina, leva à CRR, uma forma altamente destrutiva e progressiva de cárie dentária [Kielbassa *et al.*, 2000]. Em geral, ela tem início na região cervical da face vestibular dos dentes, podendo se estender para mesial e distal. Em muitos casos, a CRR apresenta-se como uma coloração marrom difusa na região cervical dos dentes e superfície lisa [Mota *et al.*, 2013; Morais-Faria *et al.*, 2016]. As lesões da CRR aumentam a fragilidade do esmalte e da estrutura dentária como um todo, culminando muitas vezes em sua amputação coronária [Kielbassa *et al.*, 2000; Springer *et al.*, 2005; Mota *et al.*, 2013; Lieshout e Bots, 2014].

Silva *et al.* [2009] analisaram 36 dentes extraídos por razões periodontais de pacientes que haviam sido submetidos à RT. Além da avaliação macroscópica e radiográfica das lesões de superfícies lisas e com aspecto marrom-difuso foram utilizados um microscópio de luz polarizada e um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os autores identificaram as zonas de cárie dentinária e os padrões de desmineralização das lesões de cárie. Desta forma, concluíram que as cáries observadas nos pacientes submetidos à radioterapia apresentam um

grau de desmineralização acentuado e que, muitas vezes, podem confundir o clínico.

Mota *et al.* [2013] verificaram a desorganização estrutural de 36 dentes com CRR e perda de matriz mineralizada na área da junção amelo-dentinária (JAD), além de perda de cemento naquela região. Foi possível observar uma “delaminação” do esmalte próximo à JAD, mesmo na estrutura mais mineral aparentemente saudável.

Morais-Faria *et al.* [2016] analisaram 10 dentes com CRR por meio de microtomografia computadorizada. Os autores demonstraram o extenso padrão radiográfico de desmineralização na região cervical dos dentes, mesmo naqueles casos em que não havia cavitação na avaliação clínica, mas apenas uma coloração marrom difusa. O estudo concluiu que a CRR é mais destrutiva do que aparenta ser.

Arnold *et al.* [2003 e 2007] avaliaram cáries convencionais (CC) em região radicular com espectroscópio de energia dispersiva de raios-X (EDX) acoplado a um MEV. Foram encontrados valores significativamente diminuídos de cálcio (Ca) e fósforo (P) em locais onde havia dentina desmineralizada quando comparado a locais de dentina sadia.

A causa real que leva à CRR ainda é incerta e alvo de muita discussão na literatura [Lieshout e Bots, 2014; Deng *et al.*, 2015; Gomes-Silva *et al.*, 2017]. Apesar disso, acredita-se que as radiações empregadas pela radioterapia possam exercer efeitos diretos ao dente, levando a alterações na morfologia microscópica do esmalte e da dentina e, conseqüentemente mudanças de microdureza dessas estruturas [Kielbassa *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2015]. Diante do exposto, este trabalho objetivou a avaliação conformacional e constitucional de dentes com CRR, comparando-os a dentes com CC e a dentes hígidos.

3.4 MATERIALE MÉTODOS

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná e aprovado em Julho de 2016, com parecer de número 1.618.336 (Anexo 1).

Vinte e quatro dentes humanos que estavam acondicionados em frascos contendo solução de formol a 10% foram selecionados no Biobanco e Biorrepositório (B&B) do Curso de Odontologia da UFPR. A seleção dos dentes foi realizada visualmente levando em consideração os aspectos macroscópicos e selecionados quanto à presença ou não de lesões de cárie e de acordo com o seu tipo. Em seguida, foram separados em três grupos distintos, a saber:

- Grupo G1CR – 8 dentes com cárie relacionada à radiação.
- Grupo G2CC – 8 dentes com cárie convencional.
- Grupo G3HG – 8 dentes hígidos (sem cárie na região cervical).

Para os dentes com CRR, foram levantados os dados dos respectivos prontuários, e foram colhidas informações referentes à RT. O principal critério de inclusão dos dentes com CRR era de que o paciente fora submetido à dose de, no mínimo, 60 Gy em região de cabeça e pescoço (Tabela 1). Os 24 dentes foram pareados de acordo com sua anatomia (Tabela 2). Quando não foi possível pareá-los de acordo com sua posição anatômica, foi feito um pareamento por similaridade estrutural. Isto é, dentes do mesmo arco, porém em lados opostos.

3.4.1 Avaliação Macroscópica

Todos os 24 dentes foram avaliados macroscopicamente a fim de se verificar a presença (G1CR e G2CC) ou não (G3HG) de lesões de cárie. Os aspectos morfológicos relacionados à perda de estrutura dentária do grupo G1CR foram determinados por dois examinadores, usando o Índice de Cárie Pós-Radioterapia (ICPR), descrito por Walker *et al.* [2008], adaptado para dentes extraídos (Tabela 3). Em seguida, os dentes foram fotografados para registro e análise comparativa, utilizando uma câmera digital Samsung® L74® com 7.2

megapixels (Samsung[®], Seul, Coréia do Sul), distância focal de 10 mm, abertura do diafragma de 1/8 s, ISO-200, tamanho de imagem de 3072 x 2304 mm, resolução de 96 dpi, padrão de cores sRGB, sem flash, distância de 15 cm do objeto.

3.4.2 Avaliação Radiográfica

Os dentes foram radiografados, com filme Dentus[®] E-Speed, 3 x 4 cm (Agfa[®] / Heraeus Kulzer[®], Mortsel, Bélgica) e aparelho emissor de raios-X Xdent[®] D70 (Xdent[®] Equipamentos Odontológicos, São Paulo, Brasil), 127 V, 70 kV, 60 Hz, 8 mA e disparo de 210 ms. Os filmes foram posicionados a 30 cm da fonte de emissão dos raios-X e os dentes foram apoiados sobre eles em posição vestibulo-lingual (1^a tomada radiográfica) e méso-distal (2^a tomada radiográfica), totalizando 48 radiografias. Os filmes foram processados em processadora automática Revell[®] (Del Grandi Produtos Radiológicos, São Paulo, Brasil) com tempo total de processamento de 5,5 minutos e temperatura interna de 27°C. Após o processamento radiográfico, as radiografias foram digitalizadas em escâner para filmes radiográficos e negativos HP Scanjet[®] G4050 (Hewlett Packard[®] Development Company, Califórnia, EUA), com resolução de 600 dpi, em tons de cinza, com auxílio do programa Digitalização HP[®] 14.5 (Hewlett Packard[®] Development Company, Califórnia, EUA).

3.4.3 Avaliação Tomográfica

Os dentes foram dispostos, grupo a grupo, em formato de semicircunferência (raio de 45 mm) e estabilizados em placas de espuma de etileno vinil acetato – EVA (Eduart, São Paulo, Brasil) de 2 mm de espessura sobre espuma com densidade 28 kg/m³ e 30 mm de espessura (Stamp Espumas, Hortolândia, Brasil). Em seguida, foram levados ao tomógrafo computadorizado de feixe cônico i-Cat[®] Next Generation (Imaging Sciences International, Hatfield, Pensilvânia), com as seguintes configurações: FOV (*field of view*) de 16 cm (diâmetro) x 13 cm (altura), resolução 0,25 voxel, tempo de aquisição 26,9 s, radiação a 120 kVp, 5 mA, 37,07 mAs.

Durante a reformatação das imagens, foram obtidos cerca de 530 cortes axiais, com espessura de 0,5 mm. Para avaliação, foi utilizado o programa iCat-Vision® versão 1.9.3.14 (CT Dent®, London, Inglaterra), com visualização de cortes a cada 1,5 mm, nos planos coronal, sagital e axial.

3.4.4 Avaliação Microtomográfica

Os dentes foram dispostos, grupo a grupo, em formato circular (raio de 20 mm) e estabilizados com cera utilidade (Lysanda® / FRX Dental Products, Maringá, Brasil). As amostras foram submetidas ao microtomógrafo computadorizado de raios-X SkyScan® 1172 (SkyScan®, Kontich, Bélgica), com potencial de 89 kV e corrente de 112 µA sem filtro. O tamanho de voxel utilizado foi de 25 µm e o tempo de exposição ao feixe de raios X para cada imagem adquirida foi de 685 ms. A resolução de câmera utilizada foi de 1336x3872 pixels. Após cada imagem de projeção adquirida, o suporte do aparelho girou 0,2° e este processo se deu até a amostra ter girado 180° da sua posição inicial. O tempo de aquisição total foi de 1h55min por grupo (8 amostras por tomada). Cerca de 1300 cortes foram adquiridos, somente da porção coronária e terço superior radicular dos dentes, com intuito de se avaliar região cervical.

O programa NRecon® versão 1.6.9.3 (SkyScan®, Kontich, Bélgica) foi usado para realizar a reformatação das imagens em secções tomográficas. Em seguida, essas secções foram processadas no software Data Viewer® versão 1.5.2.4 (SkyScan®, Kontich, Bélgica), que possibilitou a visualização das amostras nos três eixos simultaneamente.

3.4.5 Preparação dos Dentes para EDX e MEV

Duas faces de cada dente foram preparadas para avaliação constitucional (composição química, via EDX), microestrutural e microconformacional (via MEV): a) superfície dentinária - face exposta ao meio bucal na região cervical e b) face interna - corte paralelo ao longo eixo do dente, no centro da lesão de cárie em direção à câmara pulpar / canal pulpar (Figura 1). Os

dentes foram cortados e polidos à irrigação constante em duas partes, com disco de aço dupla face diamantado e segmentado 7011 (KG Sorensen®, São Paulo, Brasil), diâmetro de 22 mm e espessura de 100 µm. Em seguida, foram submetidos ao ar comprimido sob pressão para remoção de resíduos remanescentes e deixados secar à temperatura ambiente. Outros processos para limpeza da superfície não foram utilizados para que não houvesse interferência na avaliação dos compostos químicos. Após o corte, obteve-se um total de 48 amostras para análise, sendo 24 de superfície externa e 24 de face interna (corte). Em seguida, as amostras foram colocadas sobre dispositivos de alumínio do próprio MEV, com 30 mm de diâmetro, fixadas com fita dupla face 100 µm de espessura (3M® do Brasil, São Paulo, Brasil).

Depois de realizadas as análises de composição química e, antes da avaliação com o MEV, as amostras foram submetidas à metalização iônica com ouro (Au) por meio da metalizadora automática sob pressão SCD-030® (Balzers Union®, Balzers, Liechtenstein) a 0,2 mBar / 6000 PA, durante 120 s. As amostras permaneceram em câmara a vácuo Jeol® EM-DSC20® (Jeol®, Tóquio, Japão) entre as análises.

3.4.6 Avaliação Constitucional

Os dentes foram estabilizados e submetidos à análise constitucional, ou seja, à avaliação dos elementos químicos por meio do espectroscópio de energia dispersiva de raios-X (EDX, Oxford® Instruments, Abingdon, Inglaterra) acoplado ao MEV. A avaliação com EDX foi realizada com potencial de 10 kV com magnificação de 5.000x e ângulo de elevação de recepção de elétrons a 35°. Os pontos de eleição foram selecionados na face interna, no corte realizado ao longo eixo do dente, distantes 140 µm a partir da superfície em direção ao canal radicular (Figura 2).

O programa AZtec® 3.1 (Oxford® Instruments, Abingdon, Inglaterra) foi utilizado para análise dos dados obtidos da espectroscopia. Os seguintes elementos químicos foram selecionados para mensurar a quantidade relativa de acordo com seu número atômico: C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S, Cl, K e Ca. Para os cálculos estatísticos e avaliação constitucional, foram escolhidos apenas os elementos C, P e Ca.

3.4.7 Avaliação Microestrutural e Microconformacional

Os dentes foram avaliados por meio do MEV Tescan® Vega3® LMU (Tescan®, Brno, Czech Republic), com potencial de 15,0 kV, corrente de 75 μ A e distância de trabalho variável de acordo com a altura da amostra. As amostras foram observadas em sua região superficial, ou seja, a superfície exposta ao meio bucal. O MEV permitiu dois tipos de análises: a) microestrutural - observação qualitativa com aumentos de 50x, 500x, 5.000x e 25.000x; b) microconformacional - avaliação da rugosidade superficial e topografia da superfície dentinária, ambos com aumento de 500x, área projetada de 202.500 μ m² (450x450 μ m).

O programa Vega3® Control Software 4.2 (Tescan®, Brno, Czech Republic) foi utilizado para a avaliação da microestrutura. Para avaliação microconformacional, utilizou-se o programa MeX® 3D Measurement® (Alicona Imaging GmbH., Raaba, Áustria). Este programa utiliza escala de cores para visualizar diferenças de profundidades e escalas numéricas, normalmente em ordem de micrômetros, para quantificar tais informações. A medida utilizada para os cálculos estatísticos foi o 'Sz' (nome gerado pelo programa), que calcula a diferença entre a média de picos de uma determinada área e a média de vales de uma determinada área, em ' μ m'.

3.4.8 Análises Estatísticas

Os parâmetros avaliados neste estudo foram os dados das avaliações microconformacional e constitucional, obtidos por meio da MEV e EDX, respectivamente. Para microconformação, foram obtidos os dados de rugosidade e topografia da superfície dentinária, com as medidas médias entre picos e vales, nas áreas selecionadas. Para análise dos compostos químicos, foram obtidos os dados de proporção absoluta dos elementos Ca, P e C, de acordo com seu número atômico (Wt%) e de proporção relativa entre eles, sendo Ca/P e Ca/C, ambos da face interna do corte dos dentes.

A análise estatística foi realizada por meio do software Statistical Package for Social Sciences 20.0 (IBM® Inc., Chicago, EUA). A homogeneidade das variáveis foi verificada por meio do teste de Levene. O teste ANOVA entre os três grupos foi empregado a fim de analisar a correlação entre G1CR, G2CC e G3HG. Por fim, verificada a presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, foi realizado o teste de Tukey HSD para se determinar as diferenças significantes entre as médias de todos os grupos. Os valores de ' $p < 0,05$ ' foram considerados significativos.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Macromorfologia

Ao se comparar clinicamente os dentes com CRR e aqueles com CC (Figura 3, colunas 1 e 2), notou-se que esses últimos apresentavam cavitações. Aqueles que foram submetidos à radiação exibiam superfícies lisas sem cavitações, mas com manchas acastanhadas ou enegrecidas. As radiografias periapicais revelaram que os dentes com a CRR não apresentavam cavitação, porém com radiolucidez condizente com perda de estrutura mineral (Figura 3, colunas 3 e 4). No exame de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) foi possível observar imagens radiolúcidas sugestivas de uma maior área com perda mineral e as diferenças entre ambos os tipos de cáries se tornaram mais evidentes (Figura 3, colunas 5 a 7).

3.5.2 Micromorfologia

A microtomografia computadorizada mostrou que há uma diferença nas lesões de CRR quando comparadas às CC. As lesões de CRR apresentaram uma extensa área com perda de estrutura mineralizada (Figura 3, colunas 8 a 10) mesmo preservando a superfície lisa e apresentando uma coloração acastanhada na observação clínica (Figura 3, colunas 1 e 2). Por outro lado, a perda mineral de dentes com CC restringiu-se à cavitação, com menor penetração em direção à polpa.

3.5.3 Microestrutura

Os 24 dentes foram submetidos à avaliação de sua microestrutura superficial com quatro ampliações diferentes por meio da MEV. Nos aumentos de 50x e de 500x, pôde-se observar que as superfícies de CRR (Figura 4-A, e 4-B) e de dentina hígida (Figura 4-I e 4-J) eram semelhantes, pois apresentavam uma

maior regularidade superficial. Já as CC (Figura 4-E e 4-F) apresentaram uma superfície mais irregular, com presença de cavitação e presença de fissuras na estrutura mineral. Nos aumentos de 5.000x e 25.000x, observou-se a maior desorganização mineral nos dentes com CRR (Figuras 4-C e 4-D) e estrutura mais homogênea nos dentes hígidos (Figuras 4-K e 4-L).

3.5.4 Análise Microconformacional

Os dentes foram avaliados e comparados com relação à sua topografia e rugosidade por meio do MEV e o programa MeX, com observação de escala de cores e escala numérica. A rugosidade superficial dos dentes com CRR (Figura 5-A) foi menor quando comparada aos dentes com CC (Figura 5-B). Por outro lado, a essa rugosidade foi maior quando comparado aos dentes hígidos (Figura 5-C). Em média, a rugosidade superficial dos dentes com CRR foi de 47,86 μm (DP \pm 36,56 μm), de 59,44 μm (DP \pm 31,24 μm) para dentes com CC, e de 16,20 μm (DP \pm 5,71 μm) para dentes hígidos (Tabela 4). Não houve diferença estatística da rugosidade entre os diferentes tipos de cárie ($p = 0,709$), tampouco diferença estatística entre dentes com CRR e dentes hígidos ($p = 0,101$). Porém, houve diferença significativa de rugosidade entre dentes com CC e dentes hígidos ($p = 0,012$) (Tabela 5).

Na avaliação da topografia (Figuras 5-D a 5-F), os resultados foram similares. Os dentes com CRR apresentaram irregularidade topográfica (diferença entre pico máximo e profundidade mínima) de 97,93 μm (\pm 66,45 μm) em média. Nos dentes com CC, a irregularidade de topografia foi de 164,19 μm (\pm 89,19 μm) e nos dentes hígidos foi de 28,33 μm (\pm 5,98 μm). A tabela 6 apresenta os valores da topografia observada em cada dente. Não houve diferença estatística de topografia entre CRR e CC ($p = 0,162$), assim como não houve diferença estatística entre dentes com CRR e dentes hígidos ($p = 0,137$). Houve diferença significativa entre dentes com CC e dentes hígidos ($p = 0,001$) (Tabela 7).

3.5.5 Análise Constitucional

A análise quantitativa da constituição química de cada dente dos diferentes grupos e suas correlações está sintetizada na tabela 8. A espectroscopia mostrou uma redução estatisticamente significativa da quantidade de Ca e P entre os três grupos e aumento na quantidade de C (Tabela 9). A média de Ca foi menor em G1CR ($13,72 \pm 4,22 \mu\text{m}$) quando comparado a G2CC ($18,77 \pm 2,47$) e a G3HG ($22,87 \pm 1,38 \mu\text{m}$), com $p < 0,05$. A média de P foi menor em G1CR ($6,77 \pm 2,02 \mu\text{m}$) quando comparada a G2CC ($9,47 \pm 1,43$) e a G3HG ($11,72 \pm 0,47 \mu\text{m}$). A média dos átomos de C foi maior nos dentes com CRR ($42,37 \pm 7,80 \mu\text{m}$), menor naqueles com CC ($32,99 \pm 4,38 \mu\text{m}$) e menor nos dentes hígidos ($25,28 \pm 1,84 \mu\text{m}$).

As relações entre os elementos químicos também variou entre os grupos. Quando comparadas as taxas de Ca/P entre os grupos G1CR ($2,02 \pm 0,04$) e G3HG ($1,95 \pm 0,05$), foi encontrada uma redução estatisticamente significativa, com $p = 0,016$. Já a comparação entre os grupos de dentes com CC e dentes hígidos não mostrou diferença estatística, com $p = 0,300$ (Tabela 9).

3.6 DISCUSSÃO

O câncer oral é uma doença emergente em diversos países e considerada um problema de saúde pública [Mathew *et al.*, 2017]. O tratamento desta doença pode ser cirúrgico, quimioterápico e radioterápico [Dyzmann-Sroka e Malicki, 2014]. Muitos pacientes quando submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço poderão desenvolver lesões de CRR. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar as lesões de CRR sob o ponto de vista clínico, imaginológico e microscópico.

Os dentes com CRR apresentaram o aspecto acastanhado em duas ou mais faces conforme observado em trabalhos anteriores [Silva *et al.*, 2009; Mota *et al.*, 2013; Morais-Faria *et al.*, 2016]. Na maior parte dos casos, essa alteração na coloração pode confundir o clínico que pode subestimar a falta de cavitação e não dar a devida importância ao estabelecimento de um tratamento rápido e adequado [Mota *et al.*, 2013, Lieshout e Bots, 2014]. Por outro lado, os dentes com CC apresentaram cavitações pequenas e restritas a uma determinada face da região cervical.

Quando se estudam ambos os tipos de cáries com exames de imagem, o aspecto clínico sem cavitação da CRR e uma possibilidade de não haver desmineralização começa a sugerir outras hipóteses. As radiografias periapicais são capazes de mostrar imagens radiolúcidas onde aparentemente ainda não houve uma considerável perda mineral, como já descrito por Silva *et al.* [2009]. No presente estudo, pôde-se observar tal situação por meio das radiografias periapicais que também foram confirmadas com a realização da tomografia computadorizada. Nesse último, o maior grau de desmineralização das CRR frente as CC foram mais evidenciados, corroborando os trabalhos anteriores [Kielbassa *et al.*, 2000; Mota *et al.*, 2013; Morais-Faria *et al.*, 2016]. Ainda com relação à avaliação por imagens, a microtomografia confirmou a condição do alto grau de desmineralização da CRR [Morais-Faria *et al.*, 2016], enquanto que a CC demonstrou tecido desmineralizado apenas próximo da lesão. Esses mesmos achados foram observados por Morais-Faria *et al.* [2016], quando avaliaram dentes com CRR e CC por meio de microtomografia. Como puderam ser observados nos três planos de corte (sagital, coronal ou axial), os feixes de raios-X atravessaram as amostras sem resistência em algumas regiões dos dentes com CRR, ou seja, regiões aparentemente sem estrutura mineral.

Se, por um lado temos uma superfície lisa nos casos de CRR [Walker *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Mota *et al.*, 2013; Morais-Faria *et al.*, 2016] e de outro, os exames de imagem mostraram que existe perda mineral da estrutura [Kielbassa *et al.*, 2000; Morais-Faria *et al.*, 2016], deve ser analisado se existem diferenças microscópicas e na sua composição química. Trabalhos anteriores já relataram tais alterações tanto nas CRR quanto nas CC [Arnold *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2015]. O presente estudo avaliou as diferenças microestruturais e constitucionais em dentes com CRR e comparou com a CC. Essas lesões causam alterações profundas na estrutura mineral dos dentes e determinam o aumento da fragilidade dentária [Kielbassa *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2015].

Kielbassa *et al.* [2000] realizaram um estudo com microscopia de luz polarizada e mostraram que a superfície das lesões de CRR é semelhante a da dentina hígida na região cervical. Com o uso do MEV e de um programa para avaliação da topografia de superfície, verificou-se um resultado semelhante. Os dentes com CRR quando comparados aos dentes hígidos não apresentaram diferença estatisticamente significativa de irregularidade superficial, seja no aspecto de rugosidade ou de topografia. Por outro lado, houve diferença significativa quando comparada à CC que apresentou maiores irregularidades topográficas. Esta avaliação de superfície corrobora a avaliação macroscópica das amostras e condiz com os antecedentes científicos, que sugerem a falsa impressão de não haver perda de estrutura mineral [Mota *et al.*, 2013; Morais-Faria *et al.*, 2016].

A avaliação por meio da espectroscopia pôde ser usada para identificar os diferentes elementos químicos em estruturas minerais [Arnold *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2007]. No presente estudo, a análise da composição química foi condizente com os achados observados nas radiografias periapicais, tomografias e microtomografias. A relação de Ca/P refletiu a composição mineral da estrutura cristalina dos dentes. Puderam ser observadas alterações químicas significativas na comparação entre dentes com CRR e dentes hígidos, assim como outros estudos comprovaram a perda de minerais em dentina com cárie convencional *versus* dentina hígida [Arnold *et al.*, 2003]. Foi observada uma diminuição significativa de Ca e P dos dentes com CC frente aos dentes hígidos, e maior redução àqueles com CRR. Quando feita a comparação de C entre os grupos, as

diferenças foram inversas, com aumento do elemento químico nos dentes do grupos G1CR ao comparar aos demais. Os números reduzidos de Ca e P sugerem que a matriz mineral de dentes com CRR estava alterada e reforçam ainda mais aos achados dos exames de imagem. À μ CT pode-se observar grandes áreas com hipodensidade, levando a crer que ali há pouca ou nenhuma matriz mineral, sendo condizente com os achados feitos com o EDX.

Apesar de a literatura relatar que CRR e CC possuem os mesmos padrões de desmineralização [Silva *et al.*, 2009], este trabalho pôde demonstrar, com os seis tipos de análises distintas (radiografias, tomografia, microtomografia, composição química, rugosidade superficial e topografia) que existem diferenças entre ambos os tipos de cáries. As avaliações macro e microscópicas de superfície mostraram semelhanças entre CRR e dentes hígidos e diferenças significativas quando comparado à CC. As análises de imagens, bem como as análises de constituição química mostraram o oposto, pois as CRR determinam um profundo padrão de desmineralização da estrutura dentária e perda de elementos químicos, enquanto as CC apresentam um grau de desmineralização menor, mas também significativo.

As CRR podem mascarar, clinicamente, lesões agressivas e destrutivas. A aparente lisura superficial e a falta de cavitação disfarça a extensa perda de matriz mineral que ocorre na estrutura dentária, como observado nas imagens e nos índices de perdas de Ca e P, por motivos ainda não completamente elucidados.

A realização de uma pesquisa com dentes acometidos por CRR muitas vezes é prejudicada pela dificuldade em se obter as amostras. Sabe-se que a realização dos procedimentos cirúrgicos em pacientes submetidos à RT para tratamento de câncer de cabeça e pescoço é contraindicada devido à possibilidade de osteonecrose [Walker *et al.*, 2008]. Os dentes com CRR usados neste trabalho tinham sido extraídos por razões periodontais ou submetidos à coronectomia após tratamento endodôntico.

A literatura também reforça a necessidade de se fazer o pareamento das amostras em relação ao tipo de dente, à região a ser investigada e à idade do paciente [Hobson *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2008; Reed *et al.*, 2015]. Os espécimes empregados no presente estudo foram pareados levando em consideração a anatomia dos dentes e a sua região cervical. Por outro lado, não foi possível

padronizar a idade dos pacientes que doaram os dentes para os grupos controles (G2CC e G3HG), pois as lesões de cárie deveriam ser similares do ponto de vista macroscópico.

Do ponto de vista macroscópico, as lesões da CRR apresentaram-se com a sua superfície acastanhada, lisa e aparentemente íntegra. No entanto, os exames de imagem revelaram áreas radiolúcidas que sugeriram uma maior perda de estrutura mineral quando comparadas à CC. A composição química das amostras com CRR estava significativamente alterada apresentando uma diminuição de Ca e P e aumento de C. Do ponto de vista microscópico, as lesões da CRR apresentaram uma irregularidade superficial semelhante aos dentes hígidos e menor quando comparadas à CC. Vale ressaltar que a CRR é um doença multifatorial e que o clínico precisa estar atento às mudanças na microbiota, na dieta e na saliva do paciente. Todos esses fatores associados às alterações na estrutura dentária contribuem para o desenvolvimento e progressão rápida das lesões. Desta forma, o clínico precisa conhecer e diagnosticar a CRR, visando ao estabelecimento do diagnóstico diferencial e à adoção de medidas terapêuticas eficazes. Essas medidas compreendem a melhor adequação do meio bucal, com higienização e manutenção adequada e procedimentos restauradores, quando se fizerem necessários.

3.7 AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Análise de Minerais e Rochas da UFPR e aos servidores técnicos, Thiago Gomes da Silva e Leandro Keiji Maurer Ozahata.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e ao servidor técnico, Deonir Agustini.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, órgão que fomenta o programa de pós-graduação.

3.8 LEGENDAS

μ CT – microtomografia computadorizada
B&B – Biobanco e Biorrepositório (UFPR, Curitiba, Brasil)
Ca – cálcio
CC – cárie convencional
CRR – cárie relacionada à radiação
DNA – ácido desoxirribonucleico
DM – diferença média
DP – desvio padrão
EDX – espectroscópio de energia dispersiva de raios-X
EVA – espuma vinílica acetinada
G1CR – grupo 1, dentes com cárie relacionada à radiação
G2CC – grupo 2, dentes com cárie convencional
G3HG – grupo 3, dentes hígidos ou sem lesões de cárie
H – hidrogênio
ICPR – índice de cárie pós-radioterapia
INCA – Instituto Nacional do Câncer (Brasil)
JAD – junção amelo-dentinária
MEV – microscópio eletrônico de varredura
OH – hidroxila
P – fósforo
QT – quimioterapia
RT – radioterapia
TCFC – tomografia computadorizada de feixe cônico
x – vezes (magnificação)
° – grau
°C – grau Celsius
 μ A – microampère
 μ m – micrômetro
 μ m² – micrômetro quadrado
cm – centímetro
dpi – *dots per inch* (pontos por polegada)
Gy – gray

Hz – hertz

kV – quilovolt

kVp – quilovolt pico

mA – miliampère

mAs – miliampère por segundo

mBar – milibar

mm – milímetro

ms – milissegundo

PA – pascal

s – segundo

V – volt

3.9 TABELAS

Tabela 1. Dados dos pacientes submetidos a tratamento radioterápico

Dente	Sexo	Idade	Tabagista	Etilista	Local do Tumor	Tratamento	Tipo de RT	Dose de RT	Frações de RT	Fim de RT	Data da exodontia
17	M	49	Não	Não	Metástase cervical	RT	3D	66 Gy	33	Jan 2015	Out 2016
47	M	49	Não	Não	Metástase cervical	RT + QT	3D	66 Gy	33	Jan 2015	Dez 2016
21	F	61	Sim	Sim	Maxila D	RT + QT	3D	70 Gy	35	Abr 2015	Nov 2016
34	M	62	Sim	Sim	Orofaringe e língua	RT + QT	3D	60 Gy	30	Dez 2011	Out 2016
33	M	62	Sim	Sim	Orofaringe e língua	RT + QT	3D	60 Gy	30	Dez 2011	Out 2016
33	F	53	Não	Sim	Palato	Cirurgia + RT	3D	70 Gy	35	Jul 2012	Set 2016
32	M	55	Sim	Não	Orofaringe	RT + QT	3D	66 Gy	33	Fev 2016	Dez 2016
33	M	55	Sim	Não	Orofaringe	RT + QT	3D	66 Gy	33	Fev 2016	Dez 2016

M: Masculino; F: Feminino; RT: Radioterapia; QT: Quimioterapia;

Tabela 2. Pareamento dos dentes

Sigla	G1CR	G2CC	G3HG
A	17	17	17
B	47	47	47
C	21	21	21
D	34	34	34
E	33	43	33
F	33	43	33
G	32	32	32
H	33	33	33

G1CR – Grupo dos dentes com cárie relacionada à radiação; G2CC – Grupo dos dentes com cárie “convencional”; G3HG – Dentes hígidos e/ou sem lesões de cárie.

Tabela 3. Índice Dentário Pós-Radioterapia* (adaptado para dentes extraídos)

Dente	Vestibular		Oclusal		Lingual		Mesial		Distal		Totais		Médias	
	SR	SS	SR	SS	SR	SS	SR	SS	SR	SS	SR	SS	SR	SS
17	-	2	3	-	-	5	3	5	-	2	6	14	3,0	3,5
47	-	2	-	3	-	5	-	3	-	3	-	16	-	3,2
21	-	-	-	-	-	5	-	4	-	2	-	11	-	3,7
34	-	5	-	5	-	5	-	5	-	5	-	25	-	5,0
33	-	5	-	-	-	5	-	5	-	5	-	20	-	5,0
33	-	1	-	-	-	1	-	2	-	1	-	6	-	1,3
32	-	5	-	-	-	5	-	5	-	5	-	20	-	5,0
33	-	5	-	-	-	5	-	5	-	5	-	20	-	5,0

* ICPR – Índice Dentário Pós-Radioterapia, adaptado de Walker et al. (2008); RT – Radioterapia; SR – Score de Restauração; SS – Score de Superfície

Tabela 4. Análise de rugosidade superficial. Medidas entre as médias de pico e de vales da área selecionada, em μm

	A	B	C	D	E	F	G	H	Média	DP
G1CR	27,12	38,89	109,88	23,09	279,73*	15,07	227,38*	73,12	47,86	36,56
G2CC	67,01	66,25	36,67	62,97	90,19	108,21	15,47	28,79	59,44	31,24
G3HG	16,82	10,91	8,53	15,67	26,24	21,96	13,57	15,93	16,20	5,71

DP – Desvio padrão. * valores excluídos da análise.

Tabela 5. Análise estatística de rugosidade superficial

Cruzamento		[DM] μm	Erro Padrão μm	p	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite Inferior	Limite Superior
G1CR	G2CC	11,58	14,52	0,709	-48,48	25,32
G1CR	G3HG	31,66	14,52	0,101	-5,24	68,56
G2CC	G3HG	43,24 [#]	13,45	0,012	9,08	77,40

* Valores estatisticamente significantes. [DM] – Módulo da diferença média (μm)

Tabela 6. Análise de topografia superficial. Medidas entre pico máximo e vale (profundidade mínima) da área selecionada, em μm

	A	B	C	D	E	F	G	H	Média	DP
G1CR	66,59	132,90	109,90	32,65	366,69*	38,43	344,46*	207,15	97,93	66,45
G2CC	240,85	186,17	86,94	230,74	298,94	143,12	62,92	63,81	164,19	89,19
G3HG	27,86	31,09	19,20	25,01	30,94	39,75	27,69	25,11	28,33	5,98

DP – Desvio padrão. * valores excluídos da análise.

Tabela 7. Análise estatística de topografia superficial

Cruzamentos		[DM] μm	Erro Padrão μm	p	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite Inferior	Limite Superior
G1CR	G2CC	66,25	34,61	0,162	154,17	21,67
G1CR	G3HG	69,60	34,61	0,137	18,32	157,52
G2CC	G3HG	135,85*	32,04	0,001	54,46	217,25

* Valores estatisticamente significantes. [DM] – Módulo da diferença média (μm)

Tabela 8. Constituição química e taxas entre elementos químicos

	G1CR	G2CC	G3HG
Ca (Wt%)	13,72 ($\pm 4,22$)	18,77 ($\pm 2,47$)	22,87 ($\pm 1,38$)
P (Wt%)	6,77 ($\pm 2,02$)	9,47 ($\pm 1,43$)	11,72 ($\pm 0,47$)
C (Wt%)	42,37 ($\pm 7,80$)	32,99 ($\pm 4,38$)	25,28 ($\pm 1,84$)
Ca/C	0,35 ($\pm 0,17$)	0,59 ($\pm 0,14$)	0,91 ($\pm 0,12$)
Ca/P	2,02 ($\pm 0,04$)	1,99 ($\pm 0,06$)	1,95 ($\pm 0,05$)

Ca – Cálcio; P – Fósforo; C – Carbono; Ca/C – relação entre Cálcio e Carbono; Ca/P – relação entre Cálcio e Fósforo; Wt% - percentagem absoluta de massa atômica no área de incidência dos raios-X;

Tabela 9. Análise estatística de constituição química

Cruzamentos		Ca (Wt%)		C (Wt%)		P (Wt%)		Ca/C		Ca/P	
		[DM]	p	[DM]	p	[DM]	p	[DM]	p	[DM]	p
G1CR	G2CC	5,05	0,007	9,39	0,005	-2,71	0,004	0,24	0,010	0,04*	0,300
G1CR	G3HG	9,15	0,000	17,09	0,000	-4,95	0,000	0,56	0,000	0,08	0,016
G2CC	G3HG	4,10	0,028	7,71	0,021	2,25	0,015	0,33	0,001	0,04*	0,300

* Sem diferença estatística significativa. [DM] – Módulo da diferença média

3.10 ILUSTRAÇÕES

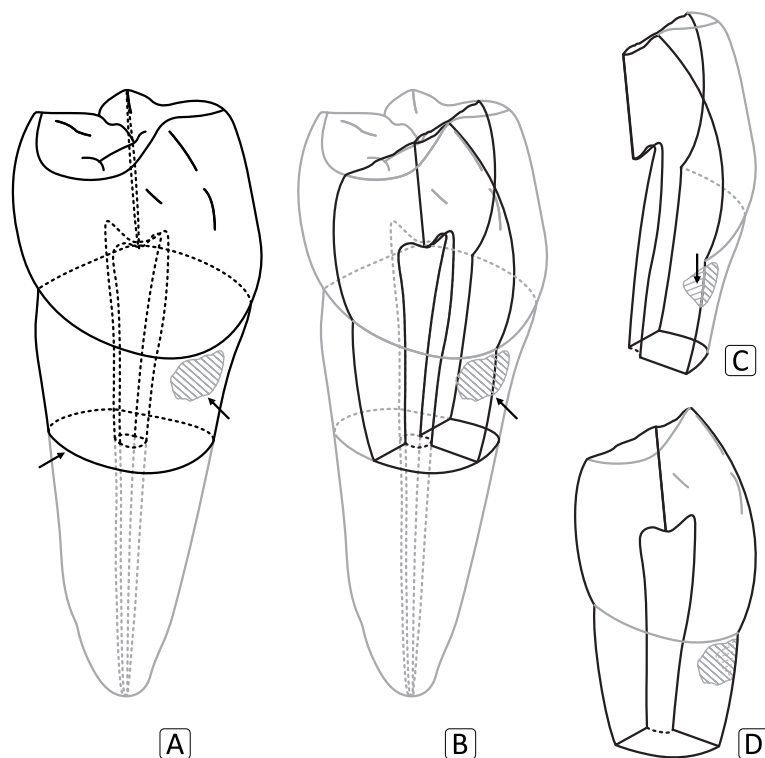


Figura 1. Desenho esquemático para preparação das amostras para análise com MEV; **A:** linha de corte abaixo da região cervical e lesão cariosa (setas); **B:** cortes longitudinais em direção à cavidade pulpar abrangendo lesão cariosa (seta); **C:** local de análise de EDX (seta); **D:** fragmento para análise de rugosidade e topografia.

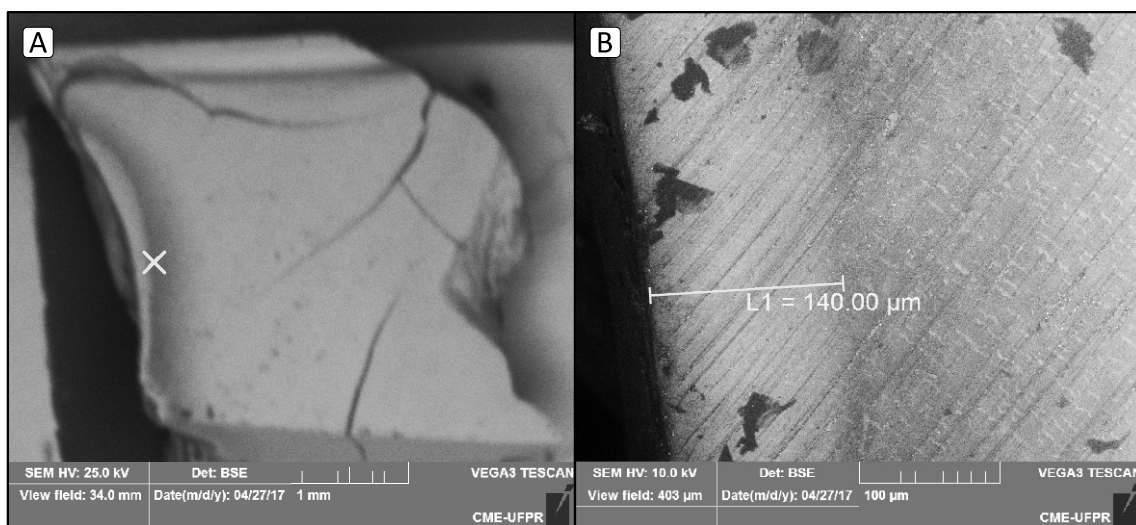


Figura 2. Região de eleição para EDX (avaliação de compostos químicos); **A:** magnificação de 32x; **B:** distância da borda externa em direção à câmara pulpar, magnificação de 686x.

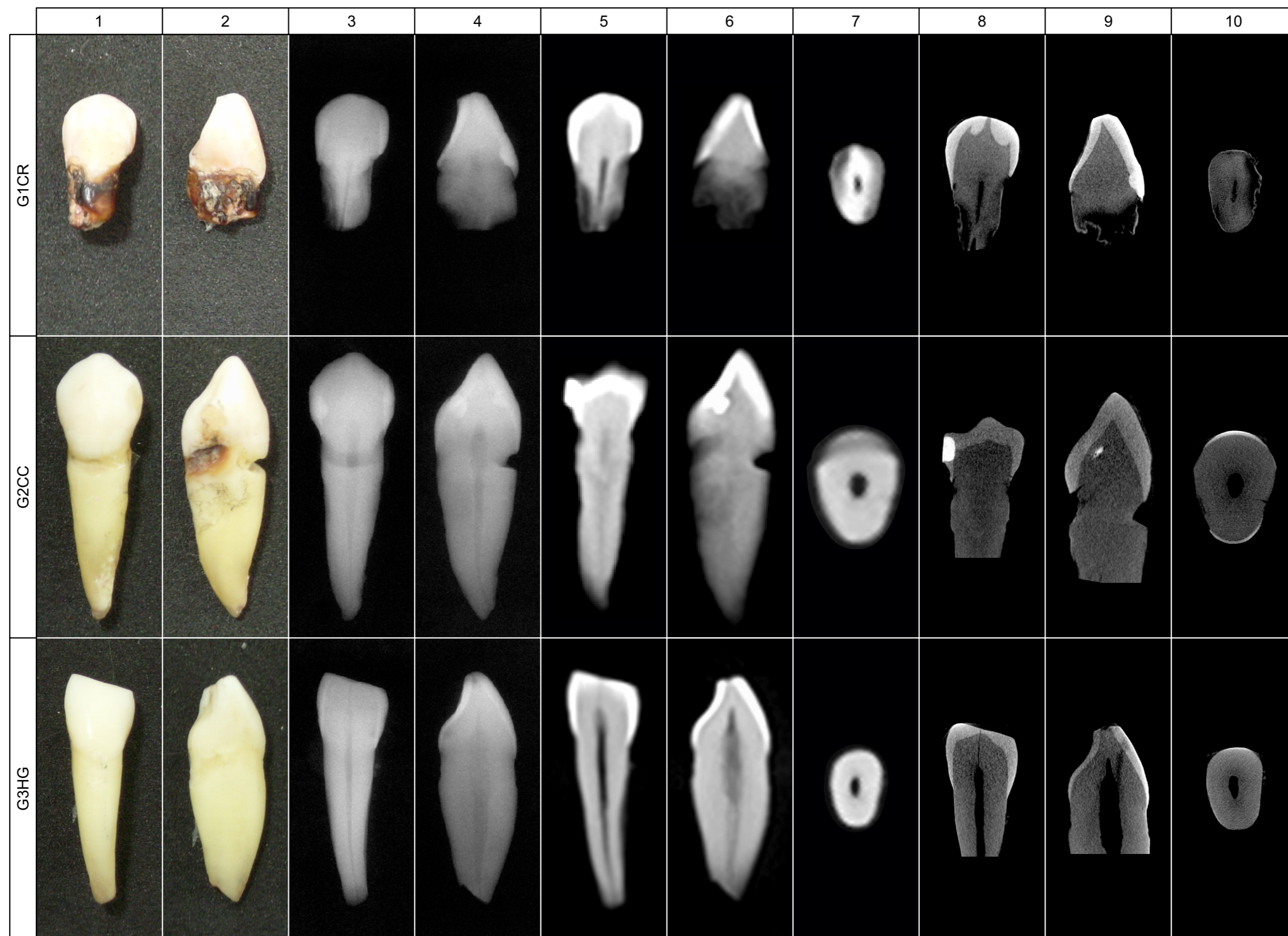


Figura 3. Morfologia dos dentes avaliados. **Linha G1CR:** canino com CRR; **G2CC:** canino com CC; **G3HG:** canino hígado. **Colunas 1 e 2:** aspecto clínico; **3 e 4:** radiografia periapical; **5 a 7:** tomografia computadorizada de feixe cônico; **8 a 10:** microtomografia computadorizada.

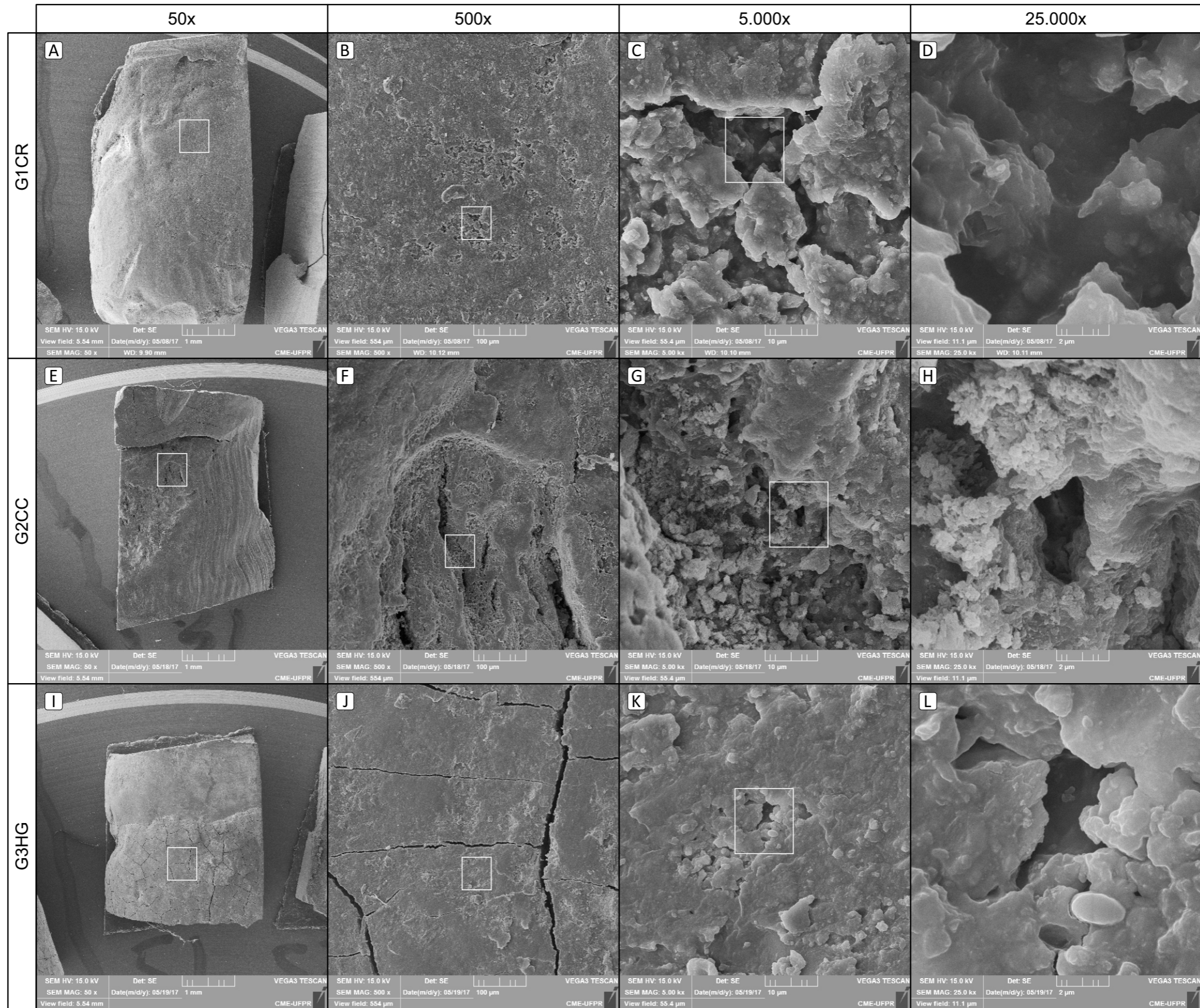


Figura 4. Imagens da superfície dentinária em Microscopia Eletrônica de Varredura. **A, B, C, D:** dentes com CRR; **E, F, G, H:** dentes com CC; **I, J, K, L:** dentes hígidos; **A, E, I:** magnificação de 50x; **B, F, J:** magnificação de 500x; **C, G, K:** magnificação de 5.000x; **D, H, L:** magnificação de 25.000x; os retângulos referem-se à área selecionada para o aumento seguinte.

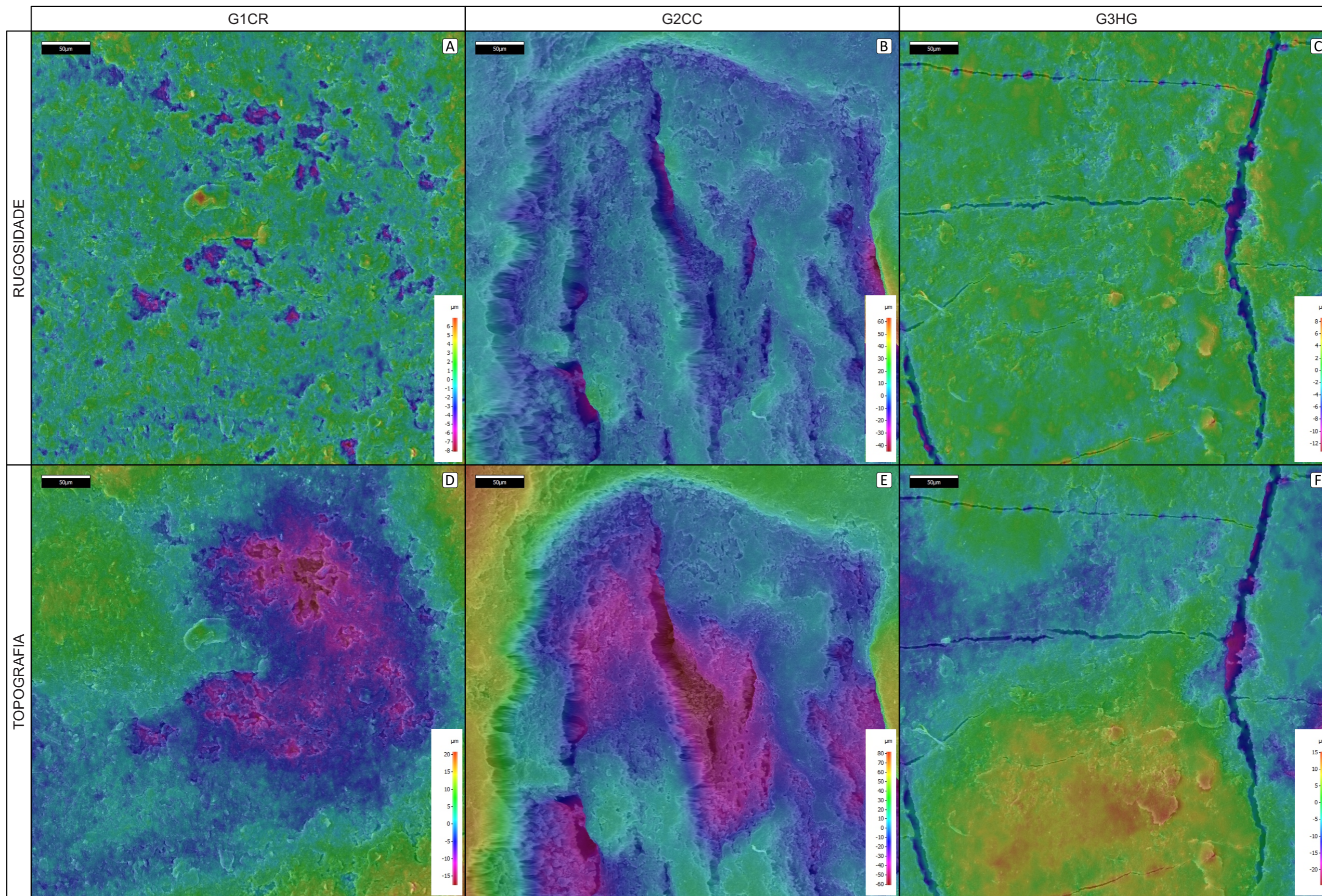


Figura 5. Imagens da superfície dentinária em Microscopia Eletrônica de Varredura. No alto, análise de rugosidade; Na linha de baixo, análise de topografia; **A, D:** G1CR; **B, E:** G2CC; **C, F:** G3HG.

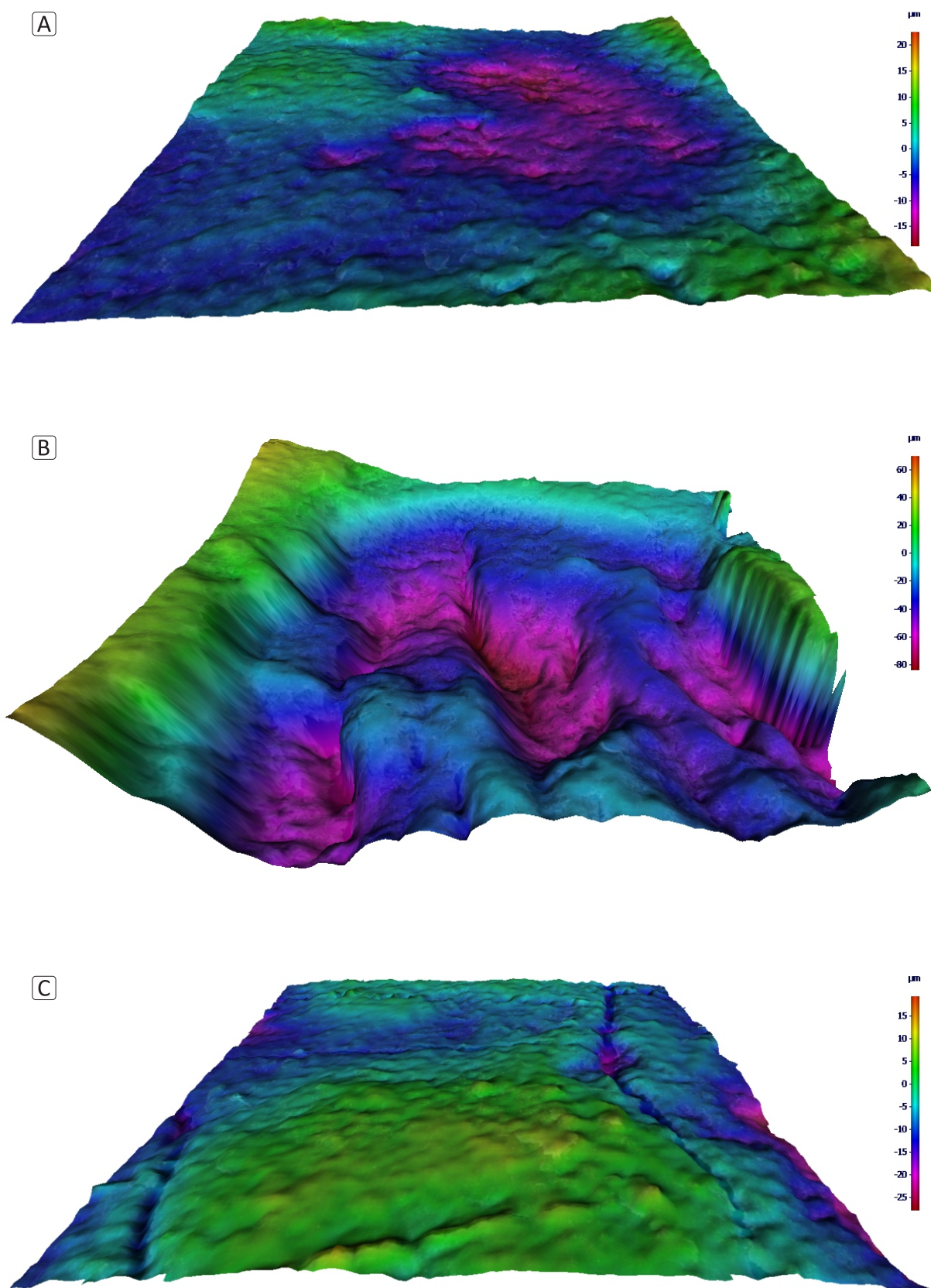


Figura 6. Projeção tridimensional de topografia superficial por meio do microscópio eletrônico de varredura; **A**, G1CR; **B**, G2CC; **C**, G3HG.

3.11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold WH, Konopka S, Kriwalsky MS, Gaengler P. Morphological analysis and chemical content of natural dentin carious lesion zones. *Ann Anat* 2003;185:419-424.
- Arnold WH, Bietau V, Renner PO, Gaengler P. Micromorphological and micronanalytical characterization of stagnating and progressing root caries lesions. *Arch Oral Biol* 2007;52:591-597.
- Deng J, Jackson L, Epstein JB, Migliorati CA, Murphy BA. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol* 2015;51:824-831.
- Dyzmann-Sroka A, Malicki J. Cancer incidence and mortality in the Greater Poland Region-Analysis of the year 2010 and future trends. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2014;19(5):296-300.
- Epstein JB, Thariat J, Bensadoun RJ, Barasch A, Murphy BA, Kolnick L, Popplewell L, Maghami E. Oral Complications of Cancer and Cancer Therapy - From Cancer Treatment to Survivorship. *CA Cancer J Clin* 2012;62:400-422.
- Gomes-Silva W, Ribeiro ACP, Brandão TB, Morais-Faria K, De Castro Jr G, Mak MP, Lopes MA, Rocha MM, Salo T, Tjäderhane L, Goes MF, Santos-Silva AR. Postradiation Matrix Metalloproteinase-20 Expression and Its Impact on Dental Micromorphology and Radiation-Related Caries. *Caries Res* 2017;51(3):216-224.
- Hobson RS, McCabe JF, Hogg SD. Bond strength to surface enamel for different tooth types. *Dent Mater* 2001;17(2):184-189.
- Hong CH, Napeñas JJ, Hodgson BD, Stokman MA, Mathers-Stauffer V, Elting LS. A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. *Support Care Cancer* 2010;18:1007-1021.
- Kielbassa A.M, Schenderab A, Schulte-Möntingc J. Microradiographic and Microscopic Studies on in situ Induced Initial Caries in Irradiated and Nonirradiated Dental Enamel. *Caries Res* 2000;34:41-47.
- Lieshout HFJ, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue - a systematic review. *Clin Oral Invest* 2014;18:17-24.

- Lima AAS, Figueiredo MAS, Loureiro MS, Duarte R. Radioterapia de neoplasias malignas na região da cabeça e pescoço – o que o Cirurgião-Dentista precisa saber. *Rev Odonto Ciência* 2001;16:156-165.
- Mathew A, Sara George P, Kalavathy M C, Padmakumari G, Jagathnath Krishna K M, Sebastian P. Cancer Incidence and Mortality: District Cancer Registry, Trivandrum, South India. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(6):1485-1491.
- Morais-Faria K, Neves-Silva R, Lopes MA, Ribeiro ACP, De Castro Jr G, Da Conceição-Vasconcelos KGM, Brandão TB, Santos-Silva AR. The wolf in sheep's clothing: Microtomographic aspects of clinically incipient radiation related caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2016;21(3):299-304.
- Mota CCBO, Gueiros LA, Maia AMA, Santos-Silva AR, Gomes ASL, Alves FA, Leao JC, Freitas AZ, Goes M, Lopes MA. Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. *Photomed Laser Surg* 2013;31(7):301-306.
- Park S, Wang DH, Zhang D, Romberg E, Arola D. Mechanical properties of human enamel as a function of age and location in the tooth. *J Mater Sci* 2008;19(6):2317-2324.
- Reed R, Xu C, Liu Y, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. *Arch Oral Biol* 2015;60(5):690-697.
- Schweyen R, Hey J, Fränzel W, Vordermark D, Hildebrandt G, Kuhnt T. Radiation-related caries: etiology and possible preventive strategies. What should the radiotherapist know? *Strahlenther Onkol* 2012;188:21-28.
- SilvaARS, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of Demineralization and Dentin Reactions in Radiation-Related Caries. *Caries Res* 2009;43:43-49.
- Silva JLF, Arruda FF. Radioterapia nos tumores de cabeça e pescoço – aspectos gerais. In: Guimarães JRQ. *Manual de oncologia*. São Paulo: BBS 2004;475-488.
- Springer IN, Niehoff P, Warnke PH, Böcek G, Kovács G, Suhr M. Radiation caries-radiogenic destruction of dental collagen. *Oral Oncol* 2005;41:723-728.

Walker MP, Wichman B, Cheng AL, Coster J, Williams KB. Impact of radiotherapy dose on dentition breakdown in head and neck cancer patients. *Pract Radiat Oncol* 2011;1:142-148.

Walker MP, Williams KB, Wichman B. Post-radiation dental index: development and reliability. *Support Care Cancer* 2008;16:525-530.

Zelic K, Milovanovic P, Rakocevic Z, Askrabic S, Potocnik J, Popovic M, Djuric M. Nano-structural and compositional basis of devitalized tooth fragility. *Dent Mater* 2014;30:476-486.

4 CONCLUSÕES

Com o presente estudo, pôde-se concluir que:

- As lesões da CRR, do ponto de vista clínico, apresentaram-se com a sua superfície acastanhada, lisa e aparentemente íntegra. No entanto, os exames de imagem revelaram áreas radiolúcidas sugerindo uma maior perda de estrutura mineral quando comparadas à CC;
- As lesões da CRR apresentaram uma irregularidade superficial semelhante aos dentes hígidos e menor quando comparadas à CC;
- A composição química dos dentes com CRR é significativamente alterada quando comparada aos demais grupos, com uma diminuição de Ca e P e aumento de C.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD W.H.; KONOPKA S.; KRIWALSKY M.S.; GAENGLER P. Morphological analysis and chemical content of natural dentin carious lesion zones. *Ann Anat*, v. 185, p. 419-424, 2003.

ARNOLD W.H.; BIETAU V.; RENNER P.O.; GAENGLER P. Micromorphological and micronanalytical characterization of stagnating and progressing root caries lesions. *Arch Oral Biol*, v. 52, p. 591-597, 2007.

BEECH N.; ROBINSON S.; PORCEDDU S.; BATSTONE M.; Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. *Aust Dent J*, v. 59, p. 20-28, 2014.

DENG J.; JACKSON L.; EPSTEIN J.B.; MIGLIORATI C.A.; MURPHY B.A. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol*, v.51, p. 824-831, 2015.

DYZMANN-SROKAA.; MALICKI J. Cancer incidence and mortality in the greater Poland region-analysis of the year 2010 and future trends. *Rep Pract Oncol Radiother*, v. 19, n. 5, p. 296-300, 2014.

EPSTEIN J.B.; THARIAT J.; BENSADOUN R.J.; BARASCH A.; MURPHY B.A.; KOLNICK L.; POPPLEWELL L.; MAGHAMI E. Oral Complications of Cancer and Cancer Therapy - From Cancer Treatment to Survivorship. *CA Cancer J Clin*, v. 62, p. 400-422, 2012.

GOMES-SILVA W.; RIBEIRO A.C.P.; BRANDÃO T.B.; MORAIS-FARIA K.; DE CASTRO JR G.; MAK M.P.; LOPES M.A.; ROCHA M.M.; SALO T.; TJÄDERHANE L.; GOES M.F.; SANTOS-SILVA A.R. Postradiation Matrix Metalloproteinase-20 Expression and Its Impact on Dental Micromorphology and Radiation-Related Caries. *Caries Res*, v. 51, n. 3, p. 216-224, 2017.

HOBSON R.S.; MCCABE J.F.; HOGG S.D. Bond strength to surfasse enamel for different tooth types. *Dent Mater*, v. 17, n. 2, p. 184-189, 2001.

HONG C.H.; NAPEÑAS J.J.; HODGSON B.D.; STOKMAN M.A.; MATHERS-STAUFFER V.; ELTING L.S. A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. *Support Care Cancer*, v. 18 p. 1007-1021, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Acesso em 01.12.2016.

KIELBASSA A.M.; SCHENDERAB A.; SCHULTE-MÖNTINGC J. Microradiographic and microscopic studies on in situ induced initial caries in irradiated and nonirradiated dental enamel. *Caries Res*, v. 34, p. 41-47, 2000.

LIESHOUT H.F.J.; BOTS C.P. The effect of radiotherapy on dental hard tissue - a systematic review. *Clin Oral Invest*, v. 18, p. 17-24, 2014.

LIMA A.A.S.; FIGUEIREDO M.A.Z.; LOUREIRO M.S.; DUARTE R. Radioterapia de neoplasias malignas na região da cabeça e pescoço – o que o Cirurgião-Dentista precisa saber. *Rev Odonto Ciência*, v. 16, p. 156-165, 2001.

MATHEW A.; SARA GEORGE P.; KALAVATHY M.C.; PADMAKUMARI G.; JAGATHNATH KRISHNA K.M.; SEBASTIAN P. Cancer Incidence and Mortality: District Cancer Registry, Trivandrum, South India. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 18, n. 6, p. 1485-1491, 2017.

MORAIS-FARIA K.; NEVES-SILVA R.; LOPES M.A.; RIBEIRO A.C.P.; DE CASTRO JR G.; DA CONCEIÇÃO-VASCONCELOS K.G.M.; BRANDÃO T.B.; SANTOS-SILVA AR. The wolf in sheep's clothing: Microtomographic aspects of clinically incipient radiation related caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 21, n. 3, p. 299-304, 2016.

MOTA C.C.B.O.; GUEIROS L.A.; MAIA A.M.A.; SANTOS-SILVA A.R.; GOMES A.S.L.; ALVES F.A.; LEO J.C.; FREITAS A.Z.; GOES M.; LOPES M.A. Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. *Photomed Laser Surg*, v. 31, n. 7, p. 301-306, 2013.

MURAD A.M.; KATZ A. *Oncologia: bases clínicas do tratamento*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

PARK S.; WANG D.H.; ZHANG D.; ROMBERG E.; AROLA D. Mechanical properties of human enamel as a function of age and location in the tooth. *J Mater Sci*, v. 19, n. 6, p. 2317-2324, 2008.

REED R, XU C, LIU Y, GORSKI JP, WANG Y, WALKER MP. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. *Arch Oral Biol*, v. 60, n. 5, p. 690-697, 2015.

SASSI L.M.; MACHADO R.A. Protocolo pré-radioterapia de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*, v. 38, n. 3, p. 208-210, 2009.

SCHWEYEN R.; HEY J.; FRÄNZEL W.; VORDERMARK D.; HILDEBRANDT G.; KUHNT T. Radiation-related caries: etiology and possible preventive strategies. What should the radiotherapist know? *Strahlenther Onkol*, v. 188, p. 21-28, 2012.

SILVA A.R.S.; ALVES F.A.; ANTUNES A.; GOES M.F.; LOPES M.A. Patterns of Demineralization and Dentin Reactions in Radiation-Related Caries. *Caries Res*, v. 43, p. 43-49, 2009.

SILVA J.L.F.; ARRUDA F.F. Radioterapia nos tumores de cabeça e pescoço – aspectos gerais. In: Guimarães JRQ. Manual de oncologia. São Paulo: BBS, p. 475-488, 2004.

SPRINGER I.N.; NIEHOFF P.; WARNKE P.H.; BÖCEK G.; KOVÁCS G.; SUHR M. Radiation caries-radiogenic destruction of dental collagen. *Oral Oncol*, v. 41, p. 723-728, 2005.

WALKER M.P.; WICHMAN B.; CHENG A.L.; COSTER J.; WILLIAMS K.B. Impact of radiotherapy dose on dentition breakdown in head and neck cancer patients. *Pract Radiat Oncol*, v. 1, p. 142-148, 2011.

WALKER M.P.; WILLIAMS K.B.; WICHMAN B. Post-radiation dental index: development and reliability. *Support Care Cancer*, v. 16, p. 525-530, 2008.

ZELIC K.; MILOVANOVIC P.; RAKOCEVIC Z.; ASKRABIC S.; POTOČNIK J.; POPOVIC M.; DJURIC M. Nano-structural and compositional basis of devitalized tooth fragility. *Dent Mater*, v. 30, p. 476-486, 2014.

6 ANEXOS

6.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise morfológica, da cristalinidade e da nanoestrutura do esmalte de dentes humanos

Pesquisador: ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56051116.8.0000.0102

Instituição Proponente: Departamento de Estomatologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.618.336

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta as pendências do projeto de pesquisa Análise morfológica, da cristalinidade e da nanoestrutura do esmalte de dentes humanos., e tem como pesquisador responsável Antonio Adilson Soares de Lima.

• No TCLE item G, completar o endereço institucional completo dos pesquisadores.

Resposta: O endereço institucional foi adicionado ao item G do TCLE.

• Anexar o instrumento onde serão registrados os dados (análises) coletados.

Resposta: o instrumento que será usado na coleta foi adicionado ao arquivo do projeto.

• Rever o item H do TCLE, que menciona como local de realização o Hospital Osvaldo Cruz.

Resposta: havia esse erro no item H do TCLE e já foi corrigido.

• Rever as palavras de difícil compreensão como nanoestrutura, análise morfológica, dentre outras.

Resposta: O TCLE foi reviso e trocamos algumas palavras que julgamos de difícil compreensão. Entretanto, ainda permaneceram as palavras nanoestrutura e análise morfológica no primeiro parágrafo, pois não há como mudar o título do projeto de pesquisa.

• Rever os benefícios, pois se há contato e possibilidade de intervenção sobre dieta, pode haver benefício direto com orientação sobre a dieta; devolutiva ao participante.

Resposta: Nós alteramos o item benefício no projeto. Muito embora, saibamos que os resultados

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-7259

E-mail: comite.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.010.330

obtidos a partir do estudo não trarão benefícios diretos para o doador dos dentes. Os dentes começam a se formar a partir da 6ª. semana de vida Intrauterina que se finalizará ao término da formação do terceiro molar. Sendo assim, mesmo que a dieta tenha tido algum impacto na formação dos tecidos dentários do doador, não haverá mais nenhum benefício direto, pois seus dentes já se formaram. No entanto, esse indivíduo poderá usar essa informação e usa-la no benefício das crianças de sua família.

• Solicita-se esclarecer na metodologia como os pesquisadores poderão atingir os objetivos propostos usando correlação com outros métodos.

Resposta: Embora esse seu questionamento não ficado muito claro para a nossa equipe. Nós criamos um quadro no capítulo da metodologia resumindo o que cada técnica poderá contribuir de informações em relação aos dentes que serão analisados.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterização estrutural e mineral de apatita de dentes humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Como as amostras (os dentes) serão provenientes do banco de dentes, elas já foram limpas e esterilizadas previamente. Desta forma, os dentes não oferecerão nenhum tipo de riscos aos pesquisadores. Além disso, os riscos relacionados a confidencialidade, ao desconforto ou constrangimento praticamente serão inexistentes, pois a identidade dos doadores será preservada de maneira que os pesquisadores só terão acesso a idade e ao sexo de cada doador.

Benefícios:

Essa pesquisa, por avaliar a morfologia, a estrutura e a cristalinidade de dentes humanos em nível microscópico e nanométrico poderá influenciar na criação de novos materiais dentários restauradores. Além disso, permitirá o melhoramento das características como a adesão, a resistência e a durabilidade dos mesmos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as pendências foram atendidas

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo
Bairro: Alto de Glória
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3380-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -**



Continuação do Parecer: 1.010.330

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_709644.pdf	24/06/2016 09:24:23		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Dentes_Nano.docx	24/06/2016 09:24:02	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_de_resposta_ao_parecerista_do_CEP.docx	24/06/2016 09:22:56	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido.docx	24/06/2016 09:19:45	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Servico_envolvido_Lamir.pdf	10/05/2016 14:29:18	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico /	Declaracao_do_servico_envolvido_Bio Banco.pdf	10/05/2016 14:18:43	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acelto

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto de Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3380-7259

E-mail: comeca.saude@ufpr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -**



Continuação do Parecer: 1.010.330

Biorepositorio / Biobanco	Declaracao_do_servico_envioado_Biobanco.pdf	10/05/2016 14:18:43	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_do_orientador.pdf	09/05/2016 11:32:47	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Check_list.pdf	03/05/2016 15:05:08	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Declaracao de Uso Especifico do Material e ou Dados Coletados.pdf	03/05/2016 15:04:54	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Termo de Compromisso para Inicio da Pesquisa.pdf	03/05/2016 15:04:37	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Termo de Confidencialidade.pdf	03/05/2016 15:04:24	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	03/05/2016 15:04:00	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_tomar_publico_os_resultados.pdf	03/05/2016 13:45:11	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Extrato_da_Ata.pdf	03/05/2016 13:45:49	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Analise_de_merito.pdf	03/05/2016 13:44:24	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Oficio_encaminhamento_da_Ata.pdf	03/05/2016 13:43:33	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto
Declaração de Pesquisadores	Oficio_encaminhamento_do_pesquisador.pdf	03/05/2016 13:42:36	ANTONIO ADILSON SOARES DE LIMA	Acerto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 01 de Julho de 2016

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Tênis
Bairro: Alto da Glória
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: comite.saude@ufpr.br

6.2 NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO

Caries Research

Caries Research

Guidelines for Authors

www.karger.com/cre_guidelines

- ▼ Aims and Scope
- ▼ Submission
- ▼ Plagiarism Policy
- ▼ Conditions
- ▼ Types of Papers
- ▼ Preparation of Manuscripts
- ▼ Color Illustrations
- ▼ References
- ▼ Color Illustrations
- ▼ Supplementary Material
- ▼ Digital Object Identifier (DOI)
- ▼ Self-Archiving/Green Open Access, *Author's Choice*[™],
Funding Organizations (NIH etc.)
- ▼ Page Charges
- ▼ Proofs
- ▼ Reprints

Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

▲

Submission

Manuscripts written in English should be submitted online:

Online Manuscript Submission

Should you experience problems with your submission, please contact:

Prof. David Beighton
(Editor-in-Chief, Caries Research)
Department of Microbiology
The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research
KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower
London Bridge SE1 9RT (UK)
Tel. +44 2071887465
Fax +44 2071887466
cre@karger.com

During the online submission you will be asked to list complete mailing addresses, including e-mail addresses of three potential reviewers for your manuscript.

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

▲

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation. If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

▲

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of Caries Research and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

For legal reasons, we must receive your '**Submission Statement**' with your original (hand-written) signature. Please download, print, sign and either fax or scan it to make it legally binding.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications. Authors of papers describing research on human subjects are required to state that they have adhered to the Declaration of Helsinki.

▲

Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope. Reviews are not subject to page charges.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

▲

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous. Lines in the manuscript must be numbered consecutively from the title page until the last page. Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;
- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489-93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Information detailing the power and sample size calculations must be included in the manuscript.

Randomized clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the CONSORT Statement. The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

Randomized clinical trials must be registered at clinicaltrials.gov or similar national authority and the trial number included in the manuscript.

Trials beginning after 1 July 2012 must be registered before recruitment of the first patient. Caries Research will accept 'retrospective registration' of trials that began before 1 July 2012 (retrospective meaning registration occurs after patient enrolment begins). When submitting a paper on a clinical trial, the trial registration number should be stated at the end of the abstract in the following format: Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number].

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surfacesoftened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. figure 2 of Zaura et al.: *Caries Res* 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and provide the position(s) of author(s) employed by commercial firms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work including relevant grant numbers. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF. Wrote the paper: AA, CC, FF, EE).

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

▲

References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

Examples

(a) *Papers published in periodicals*: Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res* 2005;39:284-286.

(b) *Papers published only with DOI numbers*: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs*: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*. Basel, Karger, 1985.

(d) *Edited books*: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): *COX-2*. *Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e) *Patents*: Diggins AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f) *World Wide Web*: Chaplin M: Water structure and behavior. www.lsbu.ac.uk/water, 2004.