UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Clínica Infantil

THAIS TEDESCHI DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DA REIRRADIAÇÃO NAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DO ESMALTE E DA DENTINA DE DENTES PERMANENTES

RIBEIRÃO PRETO – SP

2020

THAIS TEDESCHI DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DA REIRRADIAÇÃO NAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DO ESMALTE E DA DENTINA DE DENTES PERMANENTES

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP/USP) para obtenção do Título de Mestre em Ciências junto ao Programa de Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Alexandra Mussolino de Queiroz

RIBEIRÃO PRETO – SP
2020

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Thais Tedeschi

Influência da reirradiação nas propriedades químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes. Ribeirão Preto, 2020.

104p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP/USP). Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Queiroz, Alexandra Mussolino de

1. Neoplasias de cabeça e pescoço. 2. Radioterapia. 3. Cárie de Radiação. 4. Composição Química. 5. Morfologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Santos, TT. **Influência da reirradiação nas propriedades químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP/USP) para obtenção do Título de Mestre em Ciências junto ao Programa de Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria**.**

Data da Defesa: ____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

THAIS TEDESCHI DOS SANTOS

Nascimento: 17 de agosto 1993 – Jaú, São Paulo

Filiação: João Paulo dos Santos
Tânia Maria Tedeschi dos Santos

2013-2017 Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP

2018-2020 Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP

Dedico este trabalho

À Deus,

Por ser meu guia e por se fazer presente em todos os momentos de minha vida, me dando sabedoria, força e não me deixando desanimar, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por existir com tanta intensidade em meu coração.

Aos meus pais, João Paulo dos Santos e Tania Maria Tedeschi dos Santos

Que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram em todos os momentos. E que, por mais difícil que fossem as circunstâncias, sempre me transmitiram força e coragem. Agradeço por terem me dado todas as ferramentas que eu precisei para chegar até aqui. Sem vocês essa conquista jamais seria possível. Obrigada pela confiança de sempre e por acreditarem no meu sonho, tanto quanto eu. Gratidão por cada palavra de incentivo, orientação e por todo carinho que nunca me deixaram faltar. Vocês são o meu maior exemplo de amor e perseverança. Muito obrigada.

Ao amor da minha vida, Antonio João Fernandes da Silva Filho

Por todo apoio e motivação diários. Sou extremamente grata por compartilhar a vida com você, que sempre me encorajou a acreditar nos meus sonhos, nunca desistir e sempre ir à luta com garra e determinação. Você me incentiva a ir sempre além e buscar ser e fazer melhor a cada dia. Muito obrigada por todo amor, carinho e companheirismo.

À minha irmã, Ana Carolina Tedeschi dos Santos

A quem dedico todos os meus dias e esforços. Estarei sempre ao seu lado, zelando por ti e te protegendo. Meu amor e admiração por você são eternos.

À minha família e amigos,

Que iluminam de maneira especial os meus pensamentos e me encorajam a ir sempre além. Gratidão por estarem sempre ao meu lado, por todo apoio e incentivo e por fazerem os meus dias serem muito mais felizes.

Agradecimento Especial

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

A quem agradeço todas as oportunidades, orientação e apoio. Obrigada por ter me recebido como aluna, ter acreditado em mim e na minha capacidade e por me dar todas as ferramentas para crescer e evoluir como pessoa e como profissional. Você me orientou não só academicamente, mas também como pessoa e mulher. Gratidão por todo carinho e atenção que sempre teve comigo. Você é um exemplo de excelência e dedicação. Alguém a quem admiro muito e estará sempre em meu coração. Muito obrigada.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que eu chegasse até aqui e alcançasse mais este sonho. Muito obrigada a todas as pessoas que passaram em minha vida e por todas as amizades que fiz ao longo desses anos.

Em especial ao **Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira**, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo e coordenador do Centro de Tratamento em Radio-Oncologia – CTR, em Ribeirão Preto, por toda disponibilidade, orientação, apoio oferecido e fundamental colaboração para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

À **Profa. Dra. Regina Guenka Palma-Dibb**, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela orientação e disposição na realização deste trabalho. Agradeço por ceder toda a infraestrutura laboratorial para que eu pudesse realizar a pesquisa, bem como pelas oportunidades de contribuição cientifica e pela fundamental colaboração para realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela orientação e disposição na realização deste trabalho. Agradeço pela fundamental colaboração para realização deste trabalho.

À **Marília Pacífico Lucisano**, pela ajuda, disponibilidade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço imensamente.

À **Juliana Jendiroba Faraoni**, por toda disposição, paciência ao transmitir os seus conhecimentos e experiências e ajuda durante a realização das atividades laboratoriais da pesquisa. Agradeço toda dedicação para sanar minhas dúvidas e me ajudar sempre que precisei. Muito obrigada por ter me ajudado nesta jornada.

Ao **Prof. Dr. Jarbas Caiado de Castro Neto**, do Laboratório de Inovações Optrônicas para Oftalmologia e Agricultura do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – IFSC/USP, por ceder a infraestrutura laboratorial para que eu pudesse realizar a pesquisa, bem como pelas oportunidades de contribuição cientifica e pela fundamental colaboração para realização deste trabalho.

Ao pós-graduando **Vicente Silva Mattos,** pela ajuda, disponibilidade e colaboração durante todo desenvolvimento deste trabalho. Agradeço imensamente.

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do atual reitor, **Prof. Dr. Vahan Agopyan** e do vice-reitor, **Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandes.**

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, na pessoa do Diretor, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho** e do vice-diretor, **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva.**

À Coordenação de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da presidente, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e do vice-presidente **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos **Professores do Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Andiara de Rossi, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Profa. Dra. Kranya Victória Diaz Serrano, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Profa. Dra. Maria Conceição Pereira Saraiva, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. Murilo Fernando Neuppmann Feres, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho e Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva.**

Aos **Funcionários do Departamento de Clínica Infantil e Clínica de Pacientes Especiais** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, **Carolina Paes Torres Mantovani, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Fátima Aparecida Rizoli, Filomena Leli Placciti, Marco Antonio dos Santos, Marília Pacífico Lucisano Politi, Mary Possani Carmessano, Matheus Morelli Zanela e Nilza Letícia Magalhães** por toda ajuda, paciência e amizade.

Aos **Funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, **Juliana Jendiroba Faraoni Romano e Patrícia Maroki** por toda atenção e ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao **Funcionário do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Analise – LMEA,** do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – ISF/USP, **Manoel Ricardo Roncon,** por toda atenção e ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao **Corpo Clínico do Centro de Tratamento em Radio-Oncologia – CTR,** de Ribeirão Preto, **Dr. Harley Francisco de Oliveira; Dr. Erick Franz Rauber; Gustavo Lazzaro Barbi; Edenyse Christiane Bertucci Martins, Daynara Cristina Faria, Lorrayne Vieira de Sousa, Ana Claudia Silva Pereira, João César Quáquio e Rodrigo Travaini Favaro,** que me receberam, desde o primeiro dia, com muito carinho e me deram toda ajuda e atenção durante a realização de todo meu trabalho. Muito obrigada.

A todos meus **amigos e colegas da Pós-Graduação**, por todos os momentos compartilhados, amizade e convivência.

Em especial as minhas queridas amigas **Heloisa Aparecida Orsini Vieira, Lana Kei Yamamoto de Almeida, Laura Andrade Cotrim Rosa e Lisa Danielly Curcino Araújo** por todo carinho e apoio que sempre me deram. Vocês me proporcionaram os melhores momentos, conversas e risadas. Foram minha fortaleza nos momentos difíceis, fizeram os meus dias serem mais leves e a minha vida muito mais feliz. A amizade de vocês, sem dúvida alguma, é um dos maiores presentes que Deus me deu. Nossos laços serão para sempre. Muito obrigada.

"A tarefa não é ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre algo que todo mundo vê".

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Santos, TT. **Influência da reirradiação nas propriedades químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes.** Ribeirão Preto, 2020. 104p. Dissertação [Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

Um grande desafio enfrentado pela oncologia são as recidivas locorregionais de CCP, sendo necessário, por diversas vezes, um novo ciclo de tratamento. A reirradiação, utilizada extensivamente na prática clínica, adiciona maior complexidade na avaliação da toxicidade causada pela radiação, sendo de fundamental importância ampliar o conhecimento sobre os efeitos provocados pelas doses adicionais. O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, simulando um retratamento radioterápico de CCP, os efeitos da reirradiação nas propriedades do esmalte e da dentina de dentes permanentes. Este estudo avaliou as características químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de 45 molares permanentes humanos, divididos em cinco grupos: não irradiados; irradiados até dose de 60Gy e reirradiados até as doses de 30, 40 e 50Gy, por meio da análise de espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX). Os espécimes submetidos a radiação foram expostos a fração de dose de 2Gy/dia, durante cinco dias consecutivos, por seis semanas no primeiro ciclo de irradiação e por três, quatro e cinco semanas, respectivamente, no segundo ciclo. As informações obtidas por meio da espectroscopia Raman foram analisadas de forma comparativa, entre os grupos e por região, de acordo com a área geral dos espectros e a intensidade e área dos picos de interesse. Os dados foram avaliados pelo teste Kolmogorov–Smirnov, seguido por teste One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey, sendo o nível de significância adotado para todas as análises de 5%. As imagens obtidas por MEV foram analisados por meio de comparação qualitativa e os dados referentes a concentração em peso dos elementos Ca, P e O, obtidos pelo EDX, foram submetidos a análise percentual comparativa. Ao analisarmos as áreas do pico relacionado a presença de fosfato (438nm) e aos modos vibracionais da hidroxiapatita (582nm), as alterações foram significantes entre os grupos não irradiado e o irradiado em relação aos reirradiados ($p<0,05$). Por sua vez, os dados obtidos pelas áreas dos picos relacionados ao íon fosfato (960nm) e a presença de carbonato (1070nm), permitiram observar que houve diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$), sendo que tais alterações foram mais relevantes nos elementos reirradiados. Ao analisarmos a intensidade do pico relacionado a presença de fosfato (438nm) e aos modos vibracionais da hidroxiapatita (582nm), foi possível observar que houve diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$), sendo que tais alterações foram mais relevantes nos elementos reirradiados. Por sua vez, os dados obtidos pela intensidade dos picos relacionados ao íon fosfato (960nm) e a presença de carbonato (1070nm) demonstraram alterações significantes entre os grupos não irradiado e irradiado em relação aos reirradiados ($p<0,05$). Em relação as diferentes regiões analisadas, foi observado que a reirradiação atingiu o dente como um todo ($p>0,05$). Por meio da MEV foi possível observar degradação da região interprismática e destruição dos prismas de esmalte e dos cristais de hidroxiapatita. Na dentina, a reirradiação provocou obliteração dos túbulos dentinários, formação de fendas e fragmentação progressiva das fibras colágenas ao longo de todo tecido. A quantificação das substâncias presentes nestes substratos, realizada por meio do EDX, indicou um aumento na porcentagem de oxigênio e diminuição nas porcentagens de fósforo e cálcio após a reirradiação. Dessa forma, conclui-se que as alterações químicas e morfológicas observadas nos dentes permanentes reirradiados são progressivas e diretamente proporcionais ao escalonamento da dose de radiação, ocasionando danos ainda mais severos àqueles observados após irradiação.

Palavras-Chave: Neoplasia de cabeça e pescoço. Radioterapia. Cárie de Radiação. Esmalte. Dentina. Composição Química. Morfologia. Espectroscopia RAMAN.

ABSTRACT

Santos, TT. **Influence of reirradiation on the chemical and morphological properties of enamel and dentin of permanent teeth.** Ribeirão Preto, 2020. 104p. Dissertação [Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

A major challenge faced by oncology is locoregional recurrences of PCC, requiring a new treatment cycle on several occasions. Re-radiation, used extensively in clinical practice, adds greater complexity in assessing the toxicity caused by radiation, being of fundamental importance to expand the knowledge about the effects caused by additional doses. The aim of the present study was to evaluate, in vitro, simulating a radiotherapy retreatment of CCP, the effects of re-radiation on the properties of enamel and dentin of permanent teeth. This study evaluated the chemical and morphological characteristics of the enamel and dentin of 45 human permanent molars, divided into five groups: non-irradiated; irradiated up to a dose of 60 Gy and re-irradiated up to doses of 30, 40 and 50 Gy, through the analysis of Raman spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM) and X-ray dispersive energy spectroscopy (EDX). The specimens submitted to radiation were exposed to a dose fraction of 2Gy / day, for five consecutive days, for six weeks in the first irradiation cycle and for three, four and five weeks, respectively, in the second cycle. The information obtained through Raman spectroscopy was analyzed comparatively, between groups and by region, according to the general area of the spectra and the intensity and area of the peaks of interest. The data were evaluated by the Kolmogorov – Smirnov test, followed by the One-Way ANOVA test and Tukey's post-test, with the significance level adopted for all analyzes being 5%. The images obtained by SEM were analyzed by means of qualitative comparison and the data referring to the concentration in weight of the elements Ca, P and O, obtained by EDX, were submitted to comparative percentage analysis. When analyzing the peak areas related to the presence of phosphate (438nm) and to the vibrational modes of hydroxyapatite (582nm), the changes were significant between the non-irradiated and the irradiated groups in relation to the irradiated groups ($p < 0.05$). In turn, the data obtained by the peak areas related to the phosphate ion (960nm) and the presence of carbonate (1070nm), allowed us to observe that there was a statistical difference between the groups ($p < 0.05$), and such changes were more relevant elements in the re-radiated elements. When analyzing the peak intensity related to the presence of phosphate (438nm) and the vibrational modes of hydroxyapatite (582nm), it was possible to observe that there was a statistical difference between the groups ($p < 0.05$), and such changes were more relevant in re-radiated elements. In turn, the data obtained by the intensity of the peaks related to the phosphate ion (960nm) and the presence of carbonate (1070nm) demonstrated significant changes between the non-irradiated and irradiated groups in relation to the irradiated groups ($p < 0.05$). Regarding the different regions analyzed, it was observed that the re-radiation reached the tooth as a whole ($p > 0.05$). Through SEM it was possible to observe degradation of the interprismatic region and destruction of enamel prisms and hydroxyapatite crystals. In dentin, re-radiation caused obliteration of dentinal tubules, formation of cracks and progressive fragmentation of collagen fibers throughout the entire tissue. The quantification of the substances present in these substrates, carried out by means of EDX, indicated an increase in the percentage of oxygen and a decrease in the percentages of phosphorus and calcium after re-radiation. Thus, it is concluded that the chemical and morphological changes observed in the permanent irradiated teeth are progressive and directly proportional to the escalation of the radiation dose, causing even more severe damage to those observed after irradiation.

Keywords: Head and neck neoplasia. Radiotherapy. Radiation caries. Enamel. Dentin. Chemical composition. Morphology. RAMAN spectroscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

2. PROPOSIÇÃO 26

3. MATERIAL E MÉTODOS 28

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.3 PROCEDIMENTO DE IRRADIAÇÃO

3.4 ESTOCAGEM E ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL ACELERADO

3.5 PROCEDIMENTO DE REIRRADIAÇÃO

3.6 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DO ESMALTE

3.6.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

3.7 PREPARO DOS DENTES

3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO ESMALTE E DA DENTINA

3.8.1 AVALIAÇÃO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

3.9 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ESMALTE E DA DENTINA

3.9.1 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDX)

3.10 ANÁLISE DOS DADOS

4. RESULTADOS 40

4.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

4.2.1 ESMALTE

4.2.2 DENTINA

4.3 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDX)

4.3.1 ESMALTE

4.3.2 DENTINA

5. DISCUSSÃO 68

5.1 METODOLOGIA

5.2 ESMALTE

5.3 DENTINA

6. CONCLUSÃO 84

REFERÊNCIAS 86

ANEXO 102

Introdução

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o termo “câncer” é utilizado genericamente para representar um grande grupo de doenças que podem afetar diversos tecidos humanos, tendo em comum o crescimento celular desordenado com possibilidade de invasão dos tecidos e órgãos circunvizinhos e potencial desenvolvimento de metástases para outras regiões do organismo, distantes do sítio primário de desenvolvimento do tumor (HANAHAN et al., 2011, CAIRNS et al., 2011).

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países. A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento e pelo crescimento populacional, mas também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco, especialmente os associados ao desenvolvimento socioeconômico. Hoje, é possível observar a ocorrência de uma transição dos principais tipos de câncer observados nos países em desenvolvimento, com um declínio dos tipos de câncer associado à infecções e aumento daqueles associados à melhoria das condições socioeconômicas, com a incorporação de hábitos e atitudes modernos associados à urbanização (sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros) (BRAY et al., 2018; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

A mais recente estimativa mundial, realizada no ano 2018, aponta que foram diagnosticados 18 milhões de novos casos de câncer, sendo também uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, responsável por 9,6 milhões de óbitos em 2019 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). Espera-se que a incidência aumente cerca de 70% nas próximas duas décadas, sendo que, para o ano de 2030, a OMS estimou 27 milhões de novos casos de câncer, com maior prevalência em países de baixa e média rendas (OMS, 2018). Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). Globalmente, o risco cumulativo indica que um em cada oito homens e uma e em cada dez mulheres desenvolverão a doença ao longo da vida (GLOBOCAN, 2018).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde do Brasil voltado às ações nacionais integradas de prevenção e controle (diagnóstico e tratamento) de neoplasias, os agentes causais desta doença são variados, podendo ser externos ou internos ao organismo, estando ambos inter-relacionados. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. De todos os casos de câncer, 80 a 90% estão associados a fatores externos, como por exemplo, as mudanças provocadas no meio ambiente pelo homem, hábitos (cigarro, álcool, a exposição excessiva ao sol e/ou fatores alimentares) e estilo de vida (sedentarismo) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é comumente utilizado para designar um grupo heterogêneo de tumores que se originam em diferentes regiões das vias aero-digestivas altas, como cavidade bucal, faringe, laringe, cavidade nasal e seios paranasais, glândulas salivares (FERLAY et al., 2010; GAUDET et al., 2015; PALERI e ROLAND, 2016) e tireóide (ANTONIA et al., 2016; BRAY et al., 2018;). O CCP, somando-se todos os seus subsítios, ocupa o terceiro lugar em incidência, com 1.454.892 novos casos em 2018 no mundo**,** superado somente pelos tumores de pulmão (2.093.876) e mama (2.088.849) e à frente do câncer de próstata (1.276.106) (ANTONIA et al., 2016; BRAY et al., 2018; GLOBOCAN 2018). A cada ano aproximadamente 550 mil novos casos de CCP são diagnosticados no mundo, tornando-o o sétimo tipo de câncer mais comum (FITZMAURICE et al., 2017). Além disso, a incidência da doença em pessoas com menos de 50 anos parece estar aumentando (NG et al., 2017; MULLER et al., 2008). Este tipo de neoplasia acomete duas a três vezes mais homens do que mulheres (RETTIG et al., 2015) e é caracterizada pela agressividade e metástases locorregionais (KIM et al., 2002).

Dentre os fatores de risco, assim como dos cânceres em geral, podemos citar a predisposição individual, isto é, fatores genéticos hereditários, e a exposição a agentes externos que, nestes tumores, estão relacionados principalmente ao consumo de álcool e tabaco (GAUDET et al., 2015; RETTIG et al., 2015; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). Entre outros fatores de risco encontram-se a exposição ao sol sem proteção (importante fator de risco para o câncer de lábio), o excesso de gordura corporal, o contato com o papiloma vírus humano (HPV), principalmente os subtipos 16 e 18 (OMS, 2018) e fatores relacionados à exposição ocupacional a alguns elementos como pó de

madeira, produtos químicos utilizados na metalurgia, petróleo, plásticos, indústrias têxteis e o amianto (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Desde a década passada, a infecção pelo HPV, transmitido sexualmente, vem sendo reconhecida como um dos principais fatores de risco do CCP. Em razão das mudanças no comportamento sexual da população, vem sendo observado um aumento nas taxas de incidência do CCP entre a população de adultos jovens (PINTOS et al., 2008; JEMAL et al. 2011; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015; RETTIG et al., 2015) e, embora existam mais de 100 tipos de HPV, apenas uma minoria é considerada de alto risco ou carcinogênica (TOTA et al., 2011), sendo o HPV16 o responsável por mais de 90% dos casos (GILLISON et al. 2012).

O uso do tabaco também é um dos importantes fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias, sendo que já foi demonstrado que 90% dos indivíduos que apresentaram CCP consumiam habitualmente o tabaco (HASHIBE et al., 2007). O uso indiscriminado de bebidas alcoólicas, isolado de outros fatores, também aumenta a chance de desenvolvimento dos CCP, neste caso entre 1 e 4% de aumento absoluto (HASHIBE et al., 2009). O maior risco encontra-se quando há associação entre o uso de álcool e de tabaco, sendo que o risco é 30 vezes maior para os indivíduos que fumam e bebem do que para aquelas pessoas que não o fazem (AMERICAN CÂNCER SOCIETY, 2019; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). Estas duas substâncias, quando em conjunto, apresentam efeito sinérgico (RETTIG et al., 2015), potencializando o desenvolvimento de CCP (BAKER et al. 2000; SHAPIRO et al., 2000; BALLESTEROS e HEROS, 2002; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

O tratamento do CCP é complexo e de caráter multidisciplinar e multimodal. Podem ser tratados pela combinação de cirurgia, radioterapia (RT), quimioterapia, terapias alvo moleculares e/ou imunoterapia (ROSALES et al., 2009; QUING et al., 2015) e a definição da modalidade de tratamento depende de diferentes fatores como o tipo de câncer, o estadiamento e a localização do tumor, além das condições clínicas do paciente (BESSELL et al., 2011). Atualmente, a RT e a cirurgia são as modalidades de tratamento locorregional mais utilizadas (PALEARI e ROLAND et al., 2016).

A RT é uma modalidade de tratamento amplamente utilizada para este tipo de câncer, podendo ser indicada como terapia primária, adjuvante ao tratamento cirúrgico e à terapia sistêmica, ou como tratamento paliativo em estágios avançados e inoperáveis da doença

(BESSELL et al., 2011; SOARES et al., 2011). Para tumores mais avançados, a associação do tratamento cirúrgico com a RT pós-operatória ou terapia sistêmica e RT são, hoje, os protocolos de tratamento mais utilizados e eficazes (ZACKRISSON et al., 2003; PALEARI e ROLAND, 2016; LOCCA et al., 2018). Entre 42 e 84% dos pacientes com CCP são submetidos à RT dependendo da localização do tumor (NATIONAL CANCER REGISTRATION AND ANALYSIS SERVICE, 2018).

A RT se fundamenta na utilização de diversos tipos de radiação com potencial ionizante (CHASCHOUAY et al., 2011) capazes de atuar de forma direta, promovendo a inibição da divisão celular, ou indireta, por meio da produção de espécies reativas do oxigênio (*Reactive Oxygen Species* – ROS) que induzem apoptose das células malignas, reduzindo o volume tumoral irradiado (ERIKSSON et al., 2010). Este tipo de terapia pode ser administrada por meio de diferentes fontes de radiação empregando feixe de radiações ionizantes por fótons produzidos por acelerador linear, prótons produzidos por cíclotrons e isótopos radioativos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015). As radiações ionizantes podem ser eletromagnéticas ou corpusculares e carregam energia que, ao interagirem com os tecidos, podem provocar fenômenos químicos como a hidrólise da água e ruptura das cadeias de DNA das células (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015). A morte celular pode ocorrer, então, por vários mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula atingida, até sua incapacidade de reprodução (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015). A unidade internacionalmente utilizada para medir as quantidades de radiação é o Gray (Gy), que expressa a dose de radiação absorvida por qualquer material ou tecido humano (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015). De acordo com os protocolos clínicos de tratamento atuais para CCP, os pacientes submetidos a este tipo de terapia recebem uma dose total entre 50 a 70Gy como dose curativa, de acordo com a indicação terapêutica. Essas doses são fracionadas convencionalmente em um período de cinco a sete semanas, uma vez ao dia, com dose diária de 1,8 a 2Gy, durante cinco dias por semana (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2001; ROSE-PED et al., 2002; KIELBASSA et al., 2006; ERIKSSON et al., 2010).

Atualmente, existem várias modalidades de RT (convencional (2D), tridimensional (3D), RT de intensidade modulada (IMRT) e a RT por feixes de prótons) (MARTA et al., 2014). O tipo de radiação ionizante utilizada durante o tratamento oncológico, a dose total prescrita

no volume alvo, o tempo de tratamento e a combinação com outras modalidades de tratamento dependem de vários fatores como estadiamento clínico do tumor, localização, tipo de tumor, condições físicas do paciente e infraestrutura do centro médico de tratamento (HERRASSI et al., 2013). A resposta dos tecidos às radiações também vai depender de diversos fatores, tais como: sensibilidade do tumor à radiação, localização e oxigenação, assim como a qualidade e a quantidade da radiação recebida e o tempo total em que ela é administrada. Para que o efeito biológico atinja o maior número de células neoplásicas e a tolerância dos tecidos normais seja respeitada, a dose total de radiação a ser administrada é habitualmente fracionada em doses diárias (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015).

A RT é considerada uma das opções terapêuticas mais eficazes para o tratamento de CCP por sua efetividade na redução do volume do tumor primário e também pela diminuição do risco de metástases. A despeito desta efetividade da RT no contexto do tratamento do câncer sabe-se que o aumento da dose de radiação para o tumor aumenta a probabilidade de cura, no entanto, doses de radiação maiores são limitadas pelo potencial de causar danos ao tecido normal. Por este motivo, protocolos baseados em fracionamento de doses são utilizados (STEEL et al., 1989; HARRINGTON et al., 2009;). Mesmo assim, os potenciais efeitos colaterais da RT são graves e continuam sendo observados nas estruturas bucomaxilofaciais presentes no campo de radiação dos pacientes com tumores malignos nesta região (TOLETINO et al., 2011).

O objetivo da RT consiste na erradicação do câncer com o mínimo de efeitos adversos aos tecidos circunvizinhos. No entanto, embora seja uma modalidade de tratamento muito eficiente e realizada da maneira mais conservadora possível, a RT não é seletiva, ou seja, não é capaz de diferenciar células normais de células malignas e, muitas vezes, os efeitos colaterais aos tecidos adjacentes são inevitáveis (RAMPLING et al., 2003). Apesar de muitos desses efeitos serem transitórios ou intermediários, outros podem ser tardios e irreversíveis (BRODY et al., 2013; KHAW et al., 2014; GALETTI et al., 2014;), por este motivo, torna-se necessária a aceitação de um determinado grau de dano aos tecidos normais a fim de se alcançar o objetivo do tratamento (MCCAUL et al., 2012).

A efetividade da RT depende da radiossensibilidade dos tecidos e da fase da divisão celular em que se encontram as células neoplásicas (FANUCCHI et al., 2006; GLENNY et al., 2010; KHAW et al., 2014). Além disso, embora o tratamento radioterápico seja altamente

eficaz contra diferentes tipos de tumores, não é raro observar a recidiva locorregional destas doenças, recente ou tardia à cura do primeiro tumor. Essa condição exige do paciente uma nova perspectiva em relação à patologia e ao tratamento. Isso porque, quando o câncer retorna ao organismo, as novas células cancerosas, muitas vezes, tornam-se mais resistentes e agressivas e a noção de que o tratamento instituído não foi eficaz e de que há uma possível redução das chances de cura, somado ao retorno à rotina hospitalar e à situação de adoecimento, exerce forte impacto na qualidade de vida do paciente e de seus familiares (HINDS et al., 1996; ESPÍNDULA et al., 2001; VIVAR et al., 2009).

Os tipos de câncer variam em relação à sua capacidade de recidivar e nos locais em que isso pode acontecer. Por este motivo, a recidiva pode ter duas classificações possíveis: locorregional ou metastática. Quando a recidiva acontece no sítio primário ou quando envolver linfonodos ou tecidos próximos ao primeiro tumor, a recidiva é chamada de locorregional. Já nos casos em que a doença se dissemina para órgãos ou tecidos, distantes do tumor original, é dado o nome de recidiva metastática à distância (DEVITA et al., 2011). A grande diferença entre esses dois grupos está no fato de que o paciente com recidiva locorregional é, potencialmente curável. O tratamento, nestes casos, é realizado como uma segunda tentativa de cura. Na doença metastática, porém, o controle da doença muitas vezes é obtido em caráter paliativo. A estratégia a ser utilizada em qualquer um dos casos é definida a partir dos mesmos fatores considerados na primeira manifestação da doença: tipo, tamanho e localização do tumor e estado geral de saúde do paciente. A estratégia oncológica dessa vez, devido à adição de terapias, pode ocasionar toxicidade aos tecidos adjacentes de forma mais complexa e frequente (DEVITA et al., 2011).

As manifestações ou complicações mais comuns ocasionadas pela RT no CCP são: mucosite (NAIDU et al., 2004), xerostomia (JENSEN et al., 2010), candidíase (e outras infecções fúngicas), hipo ou disgeusia, perda do paladar, trismo muscular (BENSADOUN et al., 2010), dor orofacial e sensibilidade dos tecidos moles, alteração do ligamento periodontal (EPSTEIN et al., 2001), alterações microvasculares, necrose de tecidos moles, osteorradionecrose (NABIL e SAMMAN, 2011) e “cárie relacionada à radiação” (PISTOIA et al., 2004; FERGUSON et al., 2007; HONG et al., 2010; MCCAUL et al., 2012; KHAW et al., 2014). Estima-se que a incidência e a prevalência das sequelas e dos efeitos colaterais induzidos pela RT variem de 13 a 89% (OHRN et al., 2001) e frequentemente limitam a

qualidade de vida dos pacientes oncológicos (ANDREWS e GRIFFITHS, 2001; GERMANO et al., 2015).

Estudos demonstram que a “cárie relacionada à radiação” é uma das doenças que acomete, com grande frequência, pacientes submetidos a RT de CCP, afetando a qualidade de vida (SILVA et al., 2009). É uma doença complexa e destrutiva, de origem multifatorial, que apresenta características singulares que a diferem das lesões de cárie convencionais, tais como a severa destruição do esmalte e dentina (AL-NAWAS et al., 2000), progressão rápida e acometimento de locais pouco suscetíveis, como a porção incisal, a cervical e as cúspides dos dentes (KIELBASSA et al., 2006; SILVA et al., 2009; BEECH et al., 2014). Evidências científicas mostram que a prevalência de cárie dental em pacientes submetidos à RT de CCP pode ser 25% maior do que em pacientes que nunca receberam este tipo de tratamento (HONG et al., 2010) e que o risco para o desenvolvimento desta doença estará presente por toda a vida do paciente, não apenas durante ou logo após o tratamento (KIELBASSA et al., 2006). Os fatores preditivos da “cárie relacionada à radiação” são a alteração na qualidade e na quantidade de saliva, dificuldade em realizar uma higiene bucal adequada em função do desenvolvimento de mucosites e da rigidez muscular, aumento do consumo de alimentos cariogênicos e alterações na microbiota bucal (KIELBASSA et al., 2006; SILVA et al., 2009; LIESHOUT E BOTS, 2014;). Porém, os efeitos diretos da RT nas estruturas dentais (esmalte e dentina) também podem predispor à maior susceptibilidade ao desenvolvimento da “cárie relacionada à radiação”.

Os efeitos da RT nos dentes dependem da composição mineral e orgânica das estruturas do esmalte ou da dentina (GWINNETT, 1992). Estudos envolvendo dentes permanentes mostraram que a RT é capaz de provocar modificações na estrutura dental, tanto no esmalte (GONÇALVES, 2012; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; MARANGONI-LOPES et al., 2019; MELLARA et al., 2020) quanto na dentina (FERGUSON et al., 2007; MCCAUL et al., 2012; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; KHAW et al., 2014; MARANGONI-LOPES et al., 2019; MELLARA et al., 2020), tais como: destruição da estrutura prismática do esmalte dentário (GRÖTZ et al., 1998), redução nas propriedades mecânicas, como diminuição da microdureza (KIELBASSA et al., 1997; WALKER et al., 2011; MARANGONI-LOPES et al., 2019), da resistência à tração (SOARES et al., 2010), da resistência ao desgaste (JERVOE, 1970) e da resistência ao ataque de ácido (GRÖTZ et al., 1998), danos às fibrilas de colágeno (CHEUNG et al., 1990) resultando em uma redução

significativa na dureza e elasticidade do tecido dentinário (FRÄNZEL E GERLACH, 2009), aumento da solubilidade (MARKITZIU et al., 1986), atrofia dos processos odontoblásticos e obliteração de túbulos dentinários (KIELBASSA et al., 2000; MARANGONI-LOPES et al., 2019; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014) e redução da estabilidade da junção amelodentinária (KIELBASSA et al., 1997; SPRINGER et al., 2005; MCGUIRE et al., 2014b; CARPIO-BONILLA, 2016; QUEIROZ et al., 2019; QUEIROZ et al., 2020).

Pesquisas oriundas do nosso grupo, permitiram observar que após tratamento radioterápico, há destruição de colágeno (GONÇALVES et al., 2014), desorganização do esmalte e da dentina resultando em uma superfície dental amorfa (DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014), presença de fendas e túbulos dentinários destruídos e/ou colabados (GONÇALVES et al., 2014) e aumento da atividade das metaloproteinases da matriz nas regiões cervical, cúspide e fundo do sulco da junção amelodentinária (CARPIO-BONILLA, 2016; QUEIROZ et al., 2019; QUEIROZ et al., 2020). Entretanto, embora as alterações diretas que a RT pode promover nas estruturas dentais sejam conhecidas, não existe na literatura nenhum relato sobre a influência da RT nas propriedades químicas e morfológicas dos tecidos dentais em casos de pacientes submetidos à um novo tratamento radioterápico, isto é, em casos de reirradiação, após recidiva locorregional do CCP, sendo esta avaliação o objetivo do presente estudo.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, simulando um retratamento radioterápico de CCP, os efeitos da reirradiação nas propriedades químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes, por meio da análise da:

1) Composição química e estrutural do esmalte por meio da espectroscopia Raman;
2) Morfologia do esmalte e da dentina por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
3) Composição química do esmalte e da dentina por meio da espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX).

Metodologia

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (processo nº 2018.3.091.548), tendo sido aprovado (Anexo A).

3.2. Delineamento Experimental

Trata-se de um estudo experimental tendo como fator a irradiação em 5 níveis:

1) Não irradiados;
2) Irradiados até a dose de 60Gy (convencional);
3) Reirradiados até a dose de 30Gy (irradiados até a dose de 60Gy e reirradiados até dose de 30Gy);
4) Reirradiados até a dose 40Gy (irradiados até a dose de 60Gy e reirradiados até dose de 40Gy);
5) Reirradiados até a dose de 50Gy (irradiados até a dose de 60Gy e reirradiados até dose de 50Gy).

A amostra foi constituída de 45 molares permanentes de humanos, superiores e inferiores, recém-extraídos e hígidos, dentes estes oriundos de indivíduos que não foram submetidos a nenhum tratamento oncológico, obtidos junto ao Banco de Dentes da FORP/USP e armazenados em água destilada, à temperatura de 4ºC.

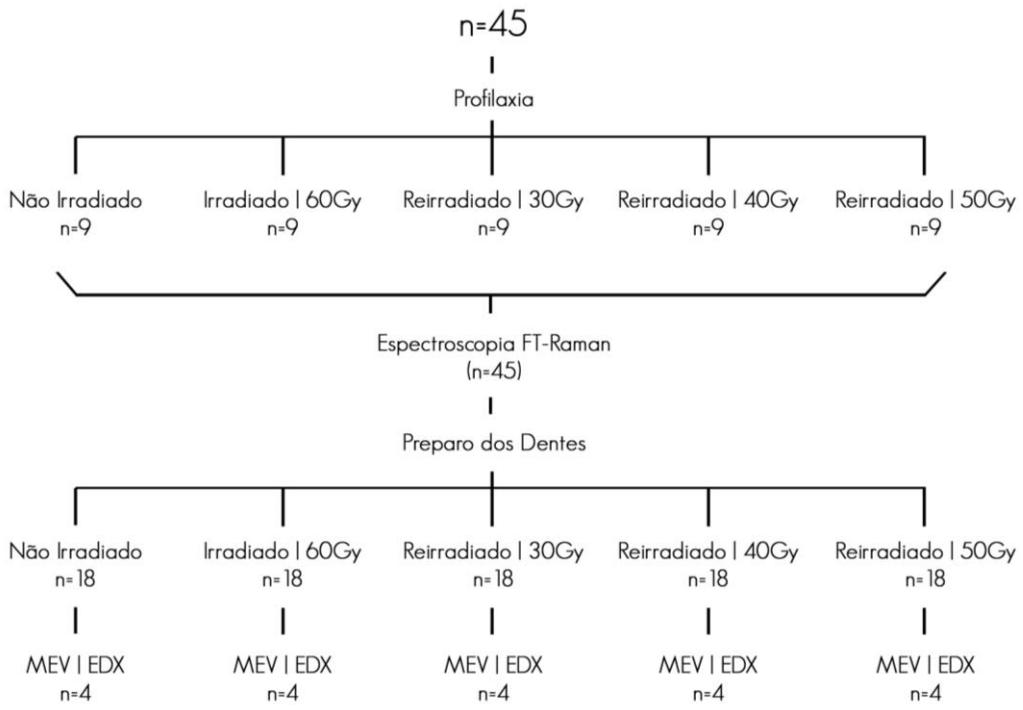
Inicialmente, os dentes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água, com auxílio de uma escova tipo Robinson montada em micromotor, em baixa rotação. Em seguida, com o auxílio de uma sonda exploradora e de um estereomicroscópio (Nikon Inc. Instrument Group, Melville, NY, EUA) com aumento de 10x, foi realizado o exame tátil e visual, a fim de selecionar apenas os dentes que não apresentavam fraturas, lesões de cárie ou anomalias de estrutura.

Após a seleção, os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% supersaturada durante uma semana. Sendo, em seguida, lavados em água por 24 horas e, então, armazenados em água destilada a 4ºC até o seu uso.

Os substratos dentais de esmalte e dentina coronária foram analisados separadamente, não sendo comparados entre si. Os espécimes foram submetidos a análise

da composição química e estrutural (Raman). Quatro espécimes de cada grupo foram separados aleatoriamente para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliação da composição química do esmalte e da dentina por meio da espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) (Fluxograma 1).

Fluxograma 1. Delineamento experimental.

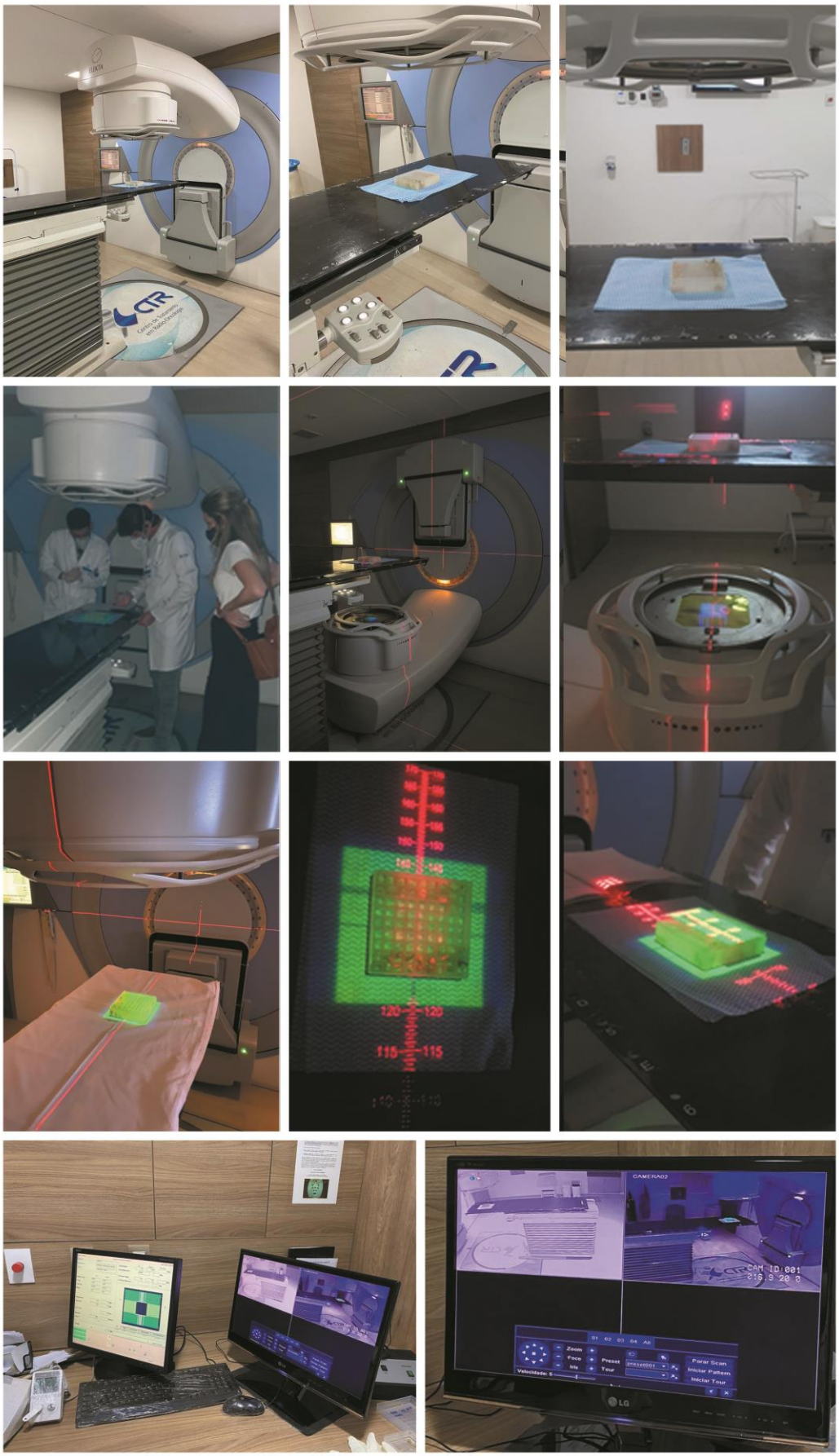


3.3. Procedimento de Irradiação

Os espécimes foram irradiados no Centro de Tratamento de Radio-Oncologia (CTR), localizado na cidade de Ribeirão Preto. Durante o procedimento de irradiação, os espécimes foram dispostos em placas de acrílico para cultura de células de 24 poços (Cellstar®, ref.657160, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Alemanha), de maneira que todos recebessem a mesma irradiação direta por unidade de área (Figura 1).

Com o intuito de mantê-los em um ambiente úmido, simulando as características da cavidade bucal, durante a irradiação, cada poço foi preenchido com 10ml de água destilada, recobrindo totalmente os cilindros de PVC. Ao final de cada procedimento, a água destilada era desprezada e os corpos de prova mantidos em saliva artificial, em estufa a 37ºC até o próximo ciclo de irradiação, quando, então, a saliva era novamente substituída por água destilada.

Figura 1. Processo de irradiação e reirradiação dos dentes em acelerador linear.



O uso da saliva artificial durante a irradiação foi evitado devido à sua alta concentração de íons, o que poderia interferir na radiação direta por unidade de área.

Inicialmente os dentes foram submetidos à irradiação em acelerador linear com energia de 6MV, dose de 60Gy, em um total de 30 frações por seis semanas, em fração de dose de 2Gy/dia, durante cinco dias consecutivos por semana (Tabela 1) (KIELBASSA et al., 2000; BULUCU et al., 2009; SOARES et al., 2010; SOARES et al., 2011; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; MCGUIRE et al., 2014b; MARTINS et al., 2015; SANTIN et al., 2015; CARPIO-BONILLA, 2016; MARANGONI-LOPES et al., 2019; QUEIROZ et al., 2019; MELLARA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020).

Tabela 1. Número de ciclos de irradiação, períodos e doses totais empregadas.

Número de frações de Irradiação	Período de tempo (semanas)	Dose Total (2Gy por fração)
5	1	10Gy
10	2	20Gy
15	3	30Gy
20	4	40Gy
25	5	50Gy
30	6	60Gy

As placas foram alinhadas equidistantes do centro do feixe e do interior para garantir taxa de dose uniforme (400UM/min) e entrega total da dose por fração. O controle de qualidade foi realizado utilizando dosímetros Nanodot (Landauer, Inc., Glenwood, IL, EUA), sendo as leituras de dose na superfície das placas utilizadas para calcular os tempos de tratamento “beam-on”. Os dosímetros foram colocados sob as placas irradiadas e calibrados de acordo com as condições de feixe descritos anteriormente.

3.4. Estocagem e envelhecimento artificial acelerado

Após o término do procedimento de irradiação convencional (dose total de 60Gy), os dentes foram armazenados em condições semelhantes às da cavidade bucal, em saliva artificial a 37ºC (±1ºC), por seis meses. Durante este período, todos os corpos de prova foram submetidos ao envelhecimento artificial acelerado por meio de termociclagem, a fim de simular o período de um ano, tempo sugerido na literatura como o mínimo necessário para ser iniciado um novo tratamento radioterápico (GALE et al., 1999).

A termociclagem simula a ingestão de alimentos quentes e frios na cavidade bucal, por meio da imersão dos espécimes em água em diferentes temperaturas. Pressupõe-se que, *in vivo,* esse ciclo ocorra de 20 a 50 vezes por dia (GALE et al., 1999). Por este motivo, os dentes foram submetidos a 500 ciclos de termociclagem semanais (Ética Equipamentos Científicos S.A., São Paulo, SP, Brasil), com temperaturas entre 5ºC e 55ºC, até que fossem completados 12.000 ciclos, simulando, aproximadamente, o período de um ano (GALE et al., 1999). Nos intervalos semanais, os espécimes permaneceram imersos em 100mL de saliva artificial, substituída diariamente, em estufa (ECB 1.3, Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brasil) à 37ºC.

Após este período, foi iniciado o procedimento de reirradiação dos espécimes até a dose de 30Gy, 40Gy e 50Gy, de acordo com o respectivo grupo.

3.5. Procedimento de reirradiação

Após o período de estocagem, seguindo as mesmas condutas do procedimento de irradiação inicial, os dentes foram submetidos à reirradiação até a dose total de 30Gy, 40Gy e 50Gy, de acordo com seu grupo, em um total de 15 frações por 3 semanas, 20 frações por 4 semanas e 25 frações por 5 semanas, respectivamente, em fração de dose de 2Gy/dia, durante 5 dias consecutivos por semana (Tabela 2).

Tabela 2. Número de ciclos de reirradiação, períodos e doses totais empregadas.

Número de frações de Irradiação	Período de tempo (semanas)	Dose Total (2Gy por fração)
5	1	10Gy
10	2	20Gy
15	3	30Gy
20	4	40Gy
25	5	50Gy

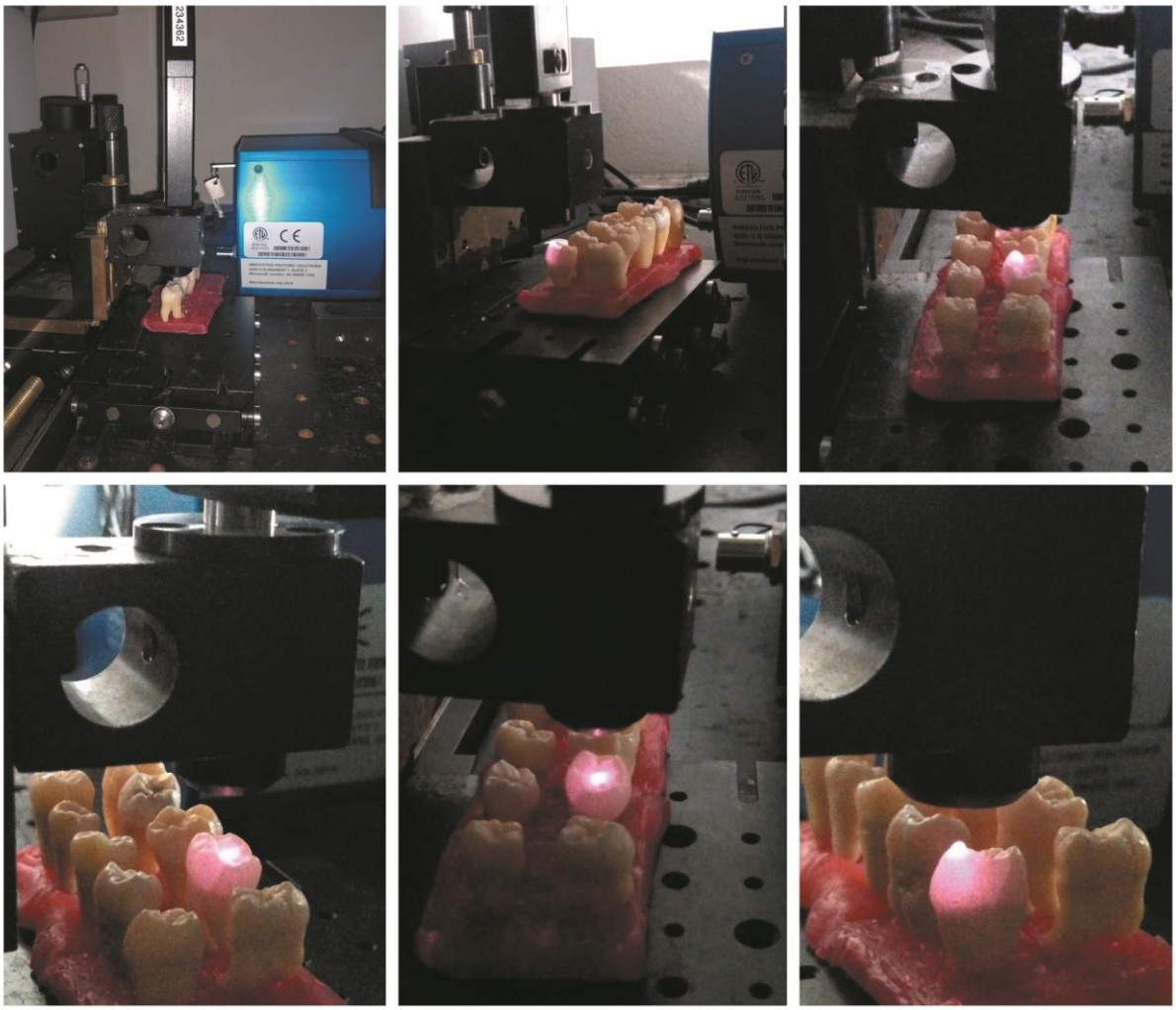
3.6. Avaliação da composição química do esmalte

3.6.1. *Espectroscopia Raman*

Após o término dos procedimentos de irradiação, todos os espécimes foram analisados por espectroscopia Raman utilizando o espectrômetro da Ocean Optics (Inc., Dunedin, FL, USA), com excitação por laser de diodo (λ=785nm) e resolução espectral de

11cm^{-1}. As medidas foram feitas com excitação na potência de 400mW, cinco segundos de aquisição e três aquisições em cada região, com o espectro final de cada região sendo a média de cada uma destas três medidas (Figura 2).

Figura 2. Processo de espectroscopia Raman.



Cada amostra forneceu um total de oito espectros, nomeados de acordo com o grupo e região analisada. As regiões analisadas em cada uma das amostras foram:

- **EC_V**: Esmalte Coronário – Face Vestibular;
- **EC_L:** Esmalte Coronário – Face Lingual/Palatina;
- **FS**: Fundo de Sulco;
- **PC**: Ponta de Cúspide;
- **JAD_V:** Junção Amelodentinária – Face Vestibular;
- **JAD_L:** Junção Amelodentinária – Face Lingual/Palatina.

Todos os espectros foram tratados utilizando rotina de processamento em MatLab que envolve:

- Remoção de ruídos para suavização da curva;
- Remoção de curva de base com uso de polinomial de ordem seis;
- Remoção de oscilações de segunda ordem no interior das curvas;
- Definição dos picos de interesse;
- Plot de Lorentziana com máximo no pico de interesse;
- Cálculo da área de cada pico de interesse;
- Cálculo da intensidade de cada pico de interesse;
- Cálculo da área total do espectro.

Os picos selecionados para análise foram (LI et al., 2010; REED et al., 2015; TIMCHENKO et al., 2016):

- 438nm: Pico relacionado a presença de fosfato;
- 582nm: Modos vibracionais v1, v3 and v4 $(PO_3)^{-4}$ na hidroxiapatita;
- 960nm: Alongamento vibracional simétrico dos íons fosfato ($(PO_4)^{-3}$);
- 1070nm: Pico relacionado a presença de carbonato.

Além disso, também foi realizada a análise da razão entre carbonato / fosfato, por meio da análise da razão entre os valores obtidos para ambos os picos.

3.7. Preparo dos Dentes

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

Cada dente foi seccionado no sentido mésio/distal, obtendo-se duas metades, uma correspondente à hemissecção vestibular e outra à hemissecção lingual ou palatina, totalizando 90 hemissecções.

As superfícies seccionadas foram lixadas com lixas d'água (Norton S/A, Curitiba, Brasil) de granulação #600 e #1200 e polidas com feltro embebido em alumina (Arotec S/A, Cotia, SP, Brasil) de 0,3µm e 0,05µm. Todo procedimento de polimento superficial foi realizado

em politriz (DP-9U2, Panambra/Strues, A/S, Copenhagen, Dinamarca), sob refrigeração (Fluxograma 2).

Fluxograma 2. Metodologia empregada na seleção e preparo dos dentes.

3.8. Análise da morfologia do esmalte e da dentina

3.8.1. Avaliação em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para este experimento foram utilizadas quatro hemissecções dentais de cada grupo, totalizando 20 hemissecções.

Para análise da superfície do tecido em microscópio eletrônico de varredura as hemissecções foram submetidas ao protocolo de: fixação (imersão em solução de glutaraldeido a 2,5% tamponado com solução de cacodilato de sódio a 0,1M com pH=7,4) em temperatura de 4ºC por 12 horas; lavagem em água destilada por três minutos; limpeza em cuba ultrassônica (UltrasonicCleaner T-1449-D, Odontobrás Ind. E Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil) contendo água destilada durante 10 minutos; aplicação de EDTA por 30 segundos; aplicação de ácido fosfórico a 37% (Gel Etchant-Kerr Corporation, Orange, USA) no esmalte por 30 segundos; remoção e lavagem com água destilada; secagem; e desidratação em graus crescentes de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, Brasil): 25% (20min), 50% (20min), 75% (20min), 95% (30min) e 100% (60min). Após a desidratação, as

hemissecções serão imersas em solução de HMDS (Hexamethyldisiloxane-Merck KgaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos para secagem química. Todos esses procedimentos foram realizados no interior de uma capela com exaustor acionado.

Depois da secagem, as hemissecções dentais foram fixadas em *stubs* com fita adesiva de carbono dupla face (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA) e cobertas com ouro em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, Foehrenwg 16, Balzers, Alemanha), com pressão de 0,01mbar, corrente de 10mA, distância de trabalho de 50mm, tempo de cobertura de 90 segundos e espessura média de deposição de 20 a 30nm.

Em seguida, foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (Philips XL30 FEG, Eindhoven, Holanda; disponibilizado pelo LMEA – Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise, do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, IFSC-US, São Carlos, São Paulo, Brasil) para verificação de possíveis alterações causadas nos substratos dentais (esmalte e dentina) e obtenção de eletromicrografias das áreas representativas com aumento de 500x e 2000x.

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

3.9. Avaliação da composição química do esmalte e dentina

3.9.1. Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

Quatro hemissecções dentais de cada grupo, totalizando 20 hemissecções dentais, foram submetidas à análise química por fluorescência de Raios X por energia dispersiva (Philips XL30 FEG, Eindhoven, Holanda – equipado com uma microssonda EDS de Raios X para análise química, disponibilizado pelo LMEA – Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise, do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, IFSC-USP, São Carlos, São Paulo, Brasil) (EDX).

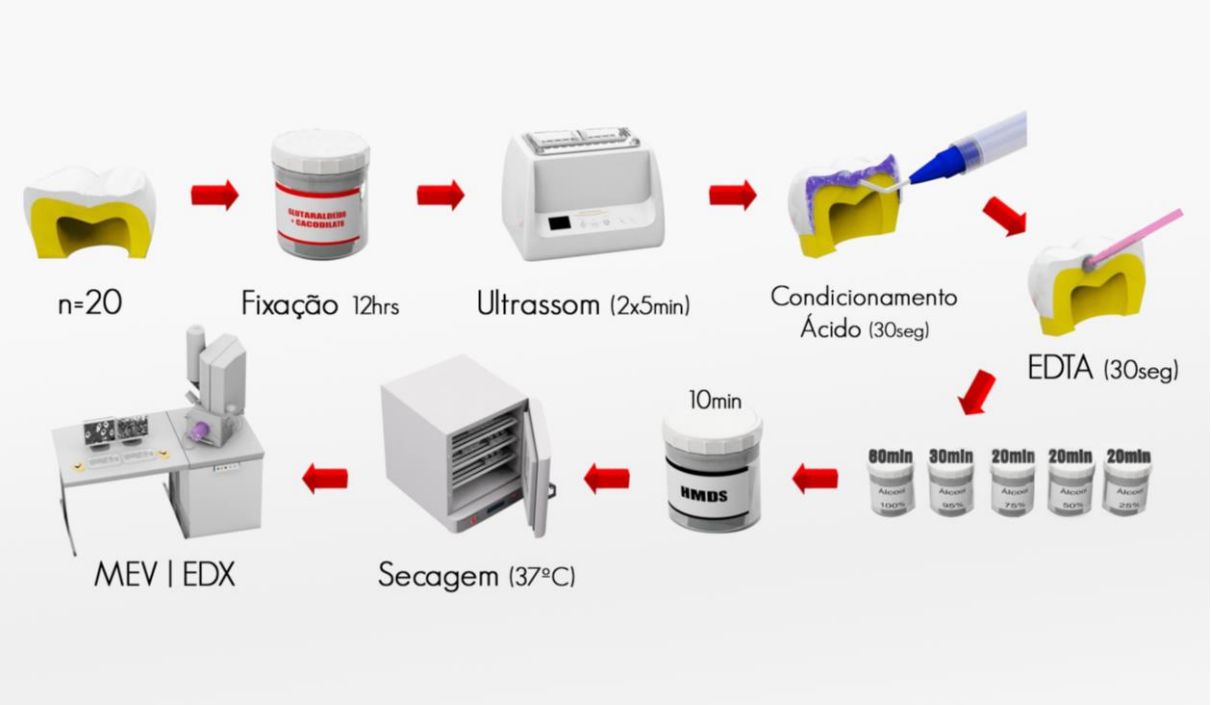
A superfície da amostra foi analisada longitudinalmente por dispersão de energia da radiação proveniente de um tubo de Rh, posicionado a 90º e acoplado a um sistema computadorizado. A amostra foi irradiada com feixe de raios X de raio de 50µm, voltagem do tubo de 50kV, com um ajuste automático da corrente, e um feixe de diâmetro de 50µm. As medidas foram realizadas durante 100 segundos por ponto.

Para cada amostra, o mapeamento dos componentes cálcio (Ca), oxigênio (O) e fósforo (P) foi realizado em linha de 40x1 pontos, com passos de 10µm, utilizando-se de 50kV, em tempo real de aquisição (um segundo por ponto), com um tempo final de escaneamento de 36 minutos por amostra. Em todas as medidas, a contagem da radiação foi feita por um detector semicondutor de Si (Li) refrigerado por nitrogênio líquido. O reagente de hidroxiapatita estequiométrica sintética (Sigma-Aldrich; Sintra, Portugal, grau de pureza 99,99% [$Ca_5HO_{13}P_3$]), foi utilizado como referência para calibração.

As condições analíticas foram baseadas no método dos parâmetros fundamentais e as variáveis para o cálculo da fórmula química foram estabelecidas para os pesos relativos de Ca, P e O, utilizado como balanço químico. O hidrogênio (H) não foi considerado no balanço total de massa, uma vez que a sua massa é equivalente a apenas 0,1% do peso total da hidroxiapatita.

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

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



3.10. Análise dos Dados

As informações obtidas por meio da espectroscopia Raman foram analisadas de forma comparativa, observando as modificações de um grupo relativo ao outro. Por este motivo, todos os espectros passaram pelo mesmo processamento e os grupos foram analisados tendo como base a média obtida entre eles, para maior consistência dos resultados. Os grupos foram comparados entre si e por região de acordo com a área geral dos espectros e a intensidade e área dos picos de interesse.

Mudanças na estrutura e composição das amostras são observadas, por meio da espectroscopia Raman, pelo aparecimento ou desaparecimento de um determinado pico ou pelo aumento ou redução da sua intensidade e/ou área. Embora este método não quantifique as mudanças ocorridas, ele consegue fornecer padrões de mudanças, baseados em dados numéricos, capazes de indicar a ocorrência de alterações estruturais e químicas consistentes dentro dessas amostras e a análise estatística foi realizada a fim de mostrar o quão relevante são essas alterações.

Inicialmente, os dados foram avaliados pelo teste Kolmogorov–Smirnov, apresentando uma distribuição normal. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey, sendo o nível de significância de 5% adotado para todas as análises. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism ® 5 (GraphPad Software In., San Diego, Califórnia, EUA).

As imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram analisados por meio de comparação qualitativa das diferentes condições experimentais propostas no estudo.

Os dados referentes a concentração em peso dos elementos Ca, P e O, obtidos pela espectroscopia de energia dispersiva (EDX), foram submetidos a análise percentual comparativa, observando as modificações de um grupo relativo ao outro.

Resultados

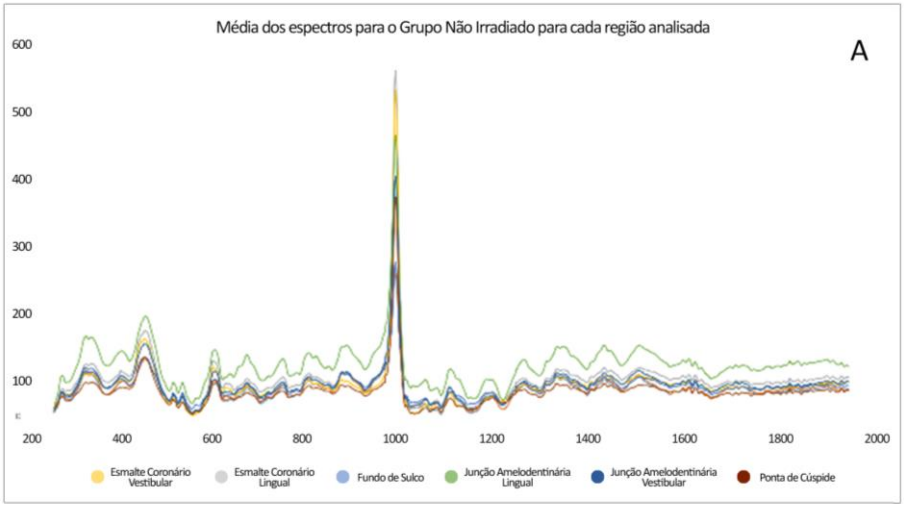
4. RESULTADOS

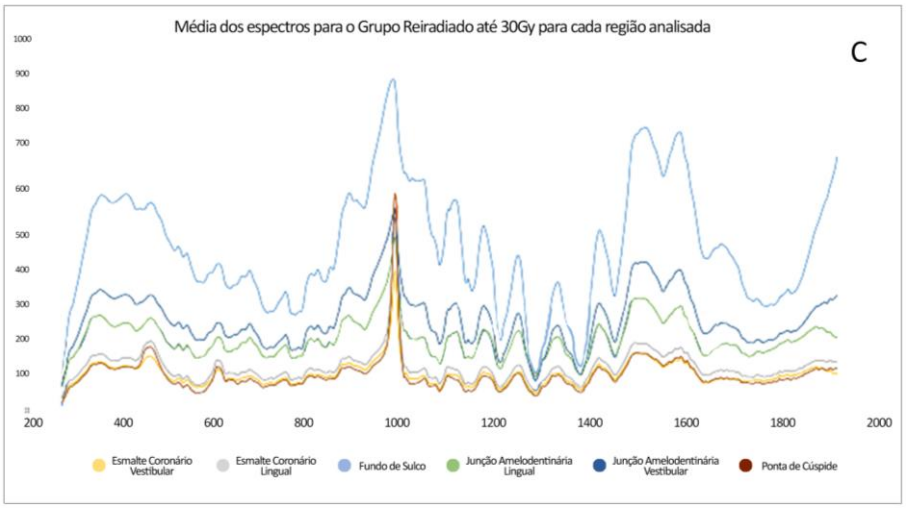
4.1. Espectroscopia Raman

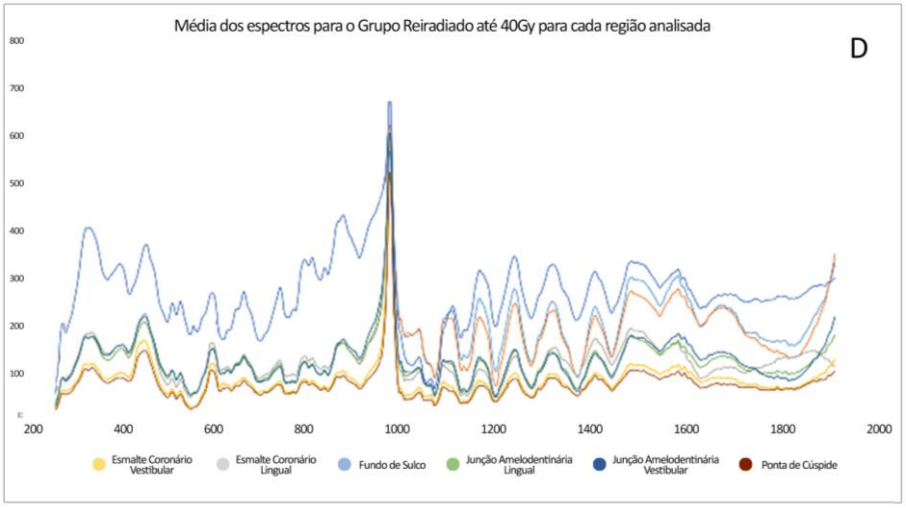
O espectro final foi obtido por meio do cálculo da média dos três espectros medidos em cada região. Esses dados foram organizados e processados a fim de obter-se a área geral dos espectros e a área e intensidade cada um dos picos de interesse.

O processamento de cada espectro, a separação de acordo com os grupos e a obtenção das médias de cada região analisada proporcionou a obtenção dos espectros apresentados na Figura 3 e 4. Ao realizarmos a análise e a correlação dessas informações, pôde-se observar que a reirradiação provocou uma variação em relação aos níveis de energia vibracional das moléculas presente no esmalte dentário e, consequentemente, mudanças nos parâmetros espectrais como: intensidade, posição e largura dos picos Raman.

Figura 3. Média dos espectros de cada um dos grupos de análise, para cada região analisada. Sendo: A – grupo não irradiado; B – grupo irradiado; C – grupo reirradiado até 30Gy; D – grupo reirradiado até 40Gy; E – grupo reirradiado até 50Gy.




Média dos espectros para o Grupo Reiradiado até 30Gy para cada região analisada
C
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
Esmalte Coronário Vestibular
Esmalte Coronário Lingual
Fundo de Sulco
Junção Amelodentinária Lingual
Junção Amelodentinária Vestibular
Ponta de Cúspide


Média dos espectros para o Grupo Reiradiado até 40Gy para cada região analisada
D
800
700
600
500
400
300
200
100
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
Esmalte Coronário Vestibular
Esmalte Coronário Lingual
Fundo de Sulco
Junção Amelodentinária Lingual
Junção Amelodentinária Vestibular
Ponta de Cúspide

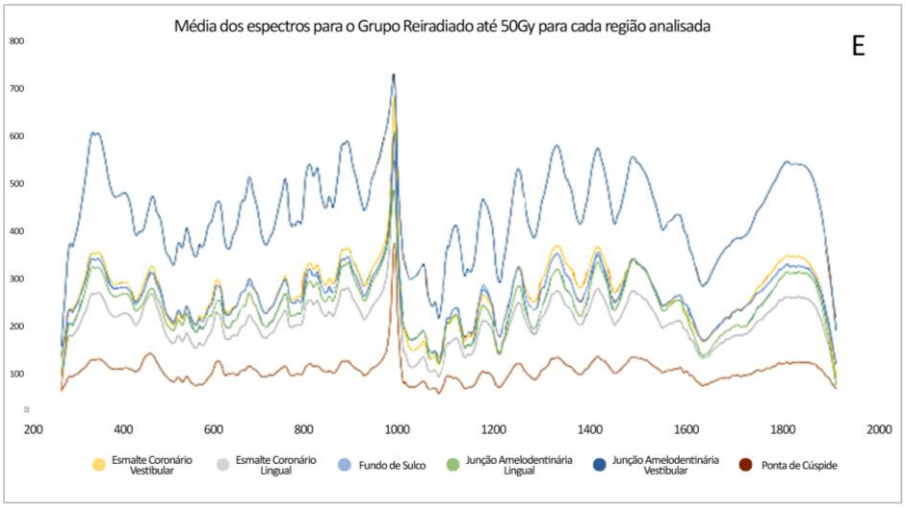
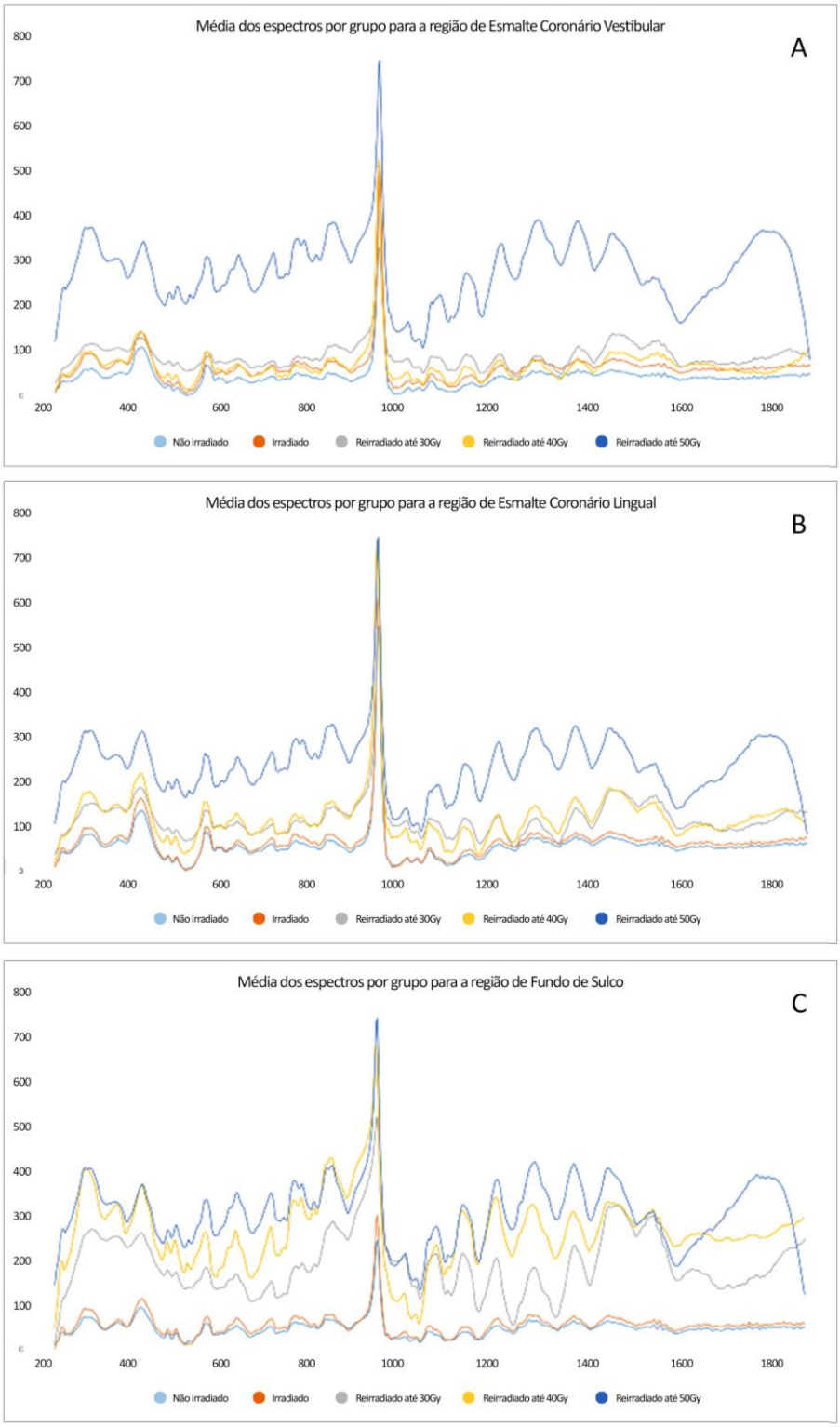
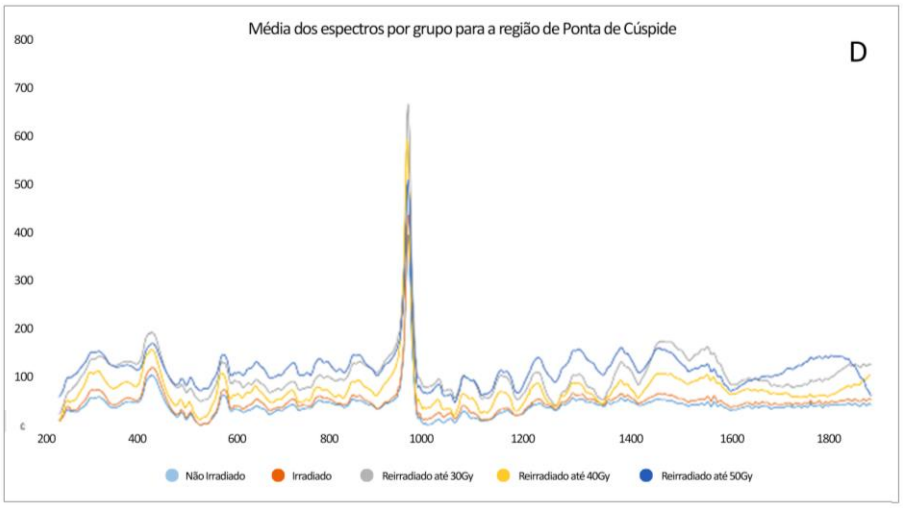
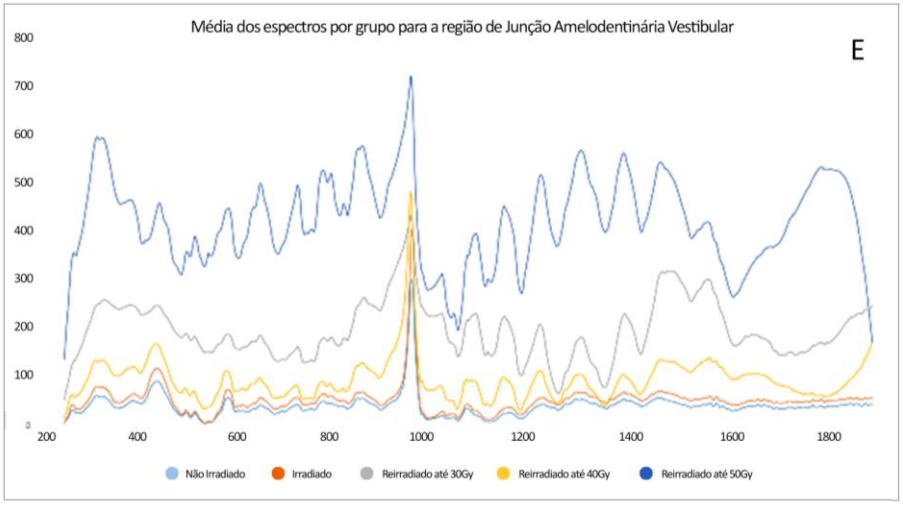
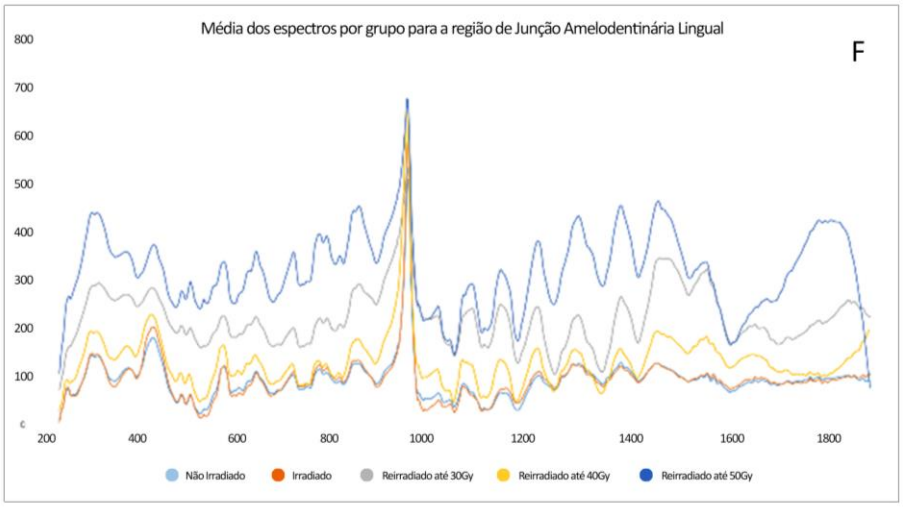

Média dos espectros para o Grupo Reiradiado até 50Gy para cada região analisada
E
800
700
600
500
400
300
200
100
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
Esmalte Coronário Vestibular
Esmalte Coronário Lingual
Fundo de Sulco
Junção Amelodentinária Lingual
Junção Amelodentinária Vestibular
Ponta de Cúspide

Figura 4. Média dos espectros para cada uma das regiões analisadas, de acordo com cada um dos grupos. Sendo: A – região de esmalte coronário vestibular; B – esmalte coronário lingual; C – fundo de sulco; D – ponta de cúspide; E – junção amelodentinária vestibular; F – junção amelodentinária lingual.




Média dos espectros por grupo para a região de Ponta de Cúspide
D
800
700
600
500
400
300
200
100
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Não Irradiado
Irradiado
Reirradiado até 30Gy
Reirradiado até 40Gy
Reirradiado até 50Gy

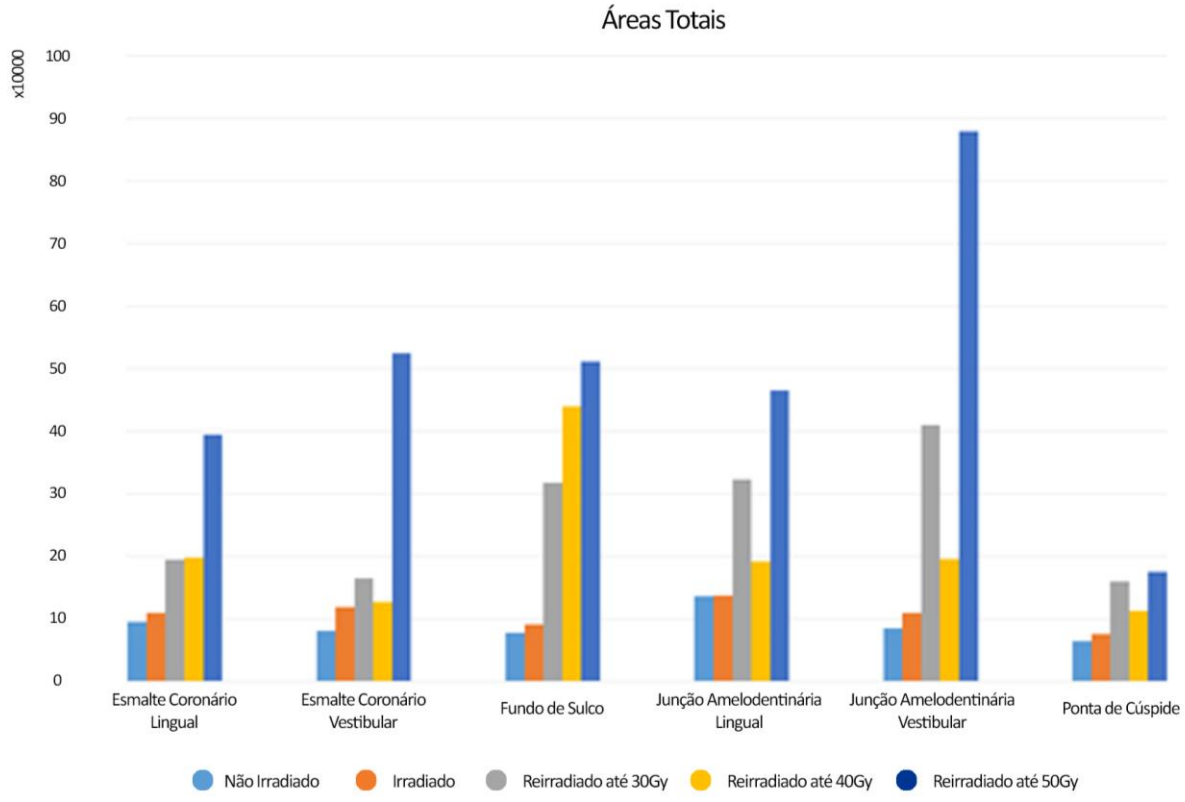

Média dos espectros por grupo para a região de Junção Amelodentinária Vestibular
E
800
700
600
500
400
300
200
100
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Não Irradiado
Irradiado
Reirradiado até 30Gy
Reirradiado até 40Gy
Reirradiado até 50Gy


Média dos espectros por grupo para a região de Junção Amelodentinária Lingual
F
800
700
600
500
400
300
200
100
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Não Irradiado
Irradiado
Reirradiado até 30Gy
Reirradiado até 40Gy
Reirradiado até 50Gy

Toda mudança no espectro é reflexo de uma alteração ocorrida na estrutura e composição química do tecido, como um todo. Por esse motivo, é importante analisar parâmetros como a área geral dos espectros e a área e intensidade cada um dos picos de interesse, a fim e verificar possíveis variações e correlaciona-las com as alterações encontradas.

O primeiro parâmetro a ser observado foram as áreas totais dos espectros (Figura 5). Ao analisarmos os dados foi possível observar uma tendência de aumento das áreas totais dos gráficos, com o aumento da dose de radiação sobre as amostras.

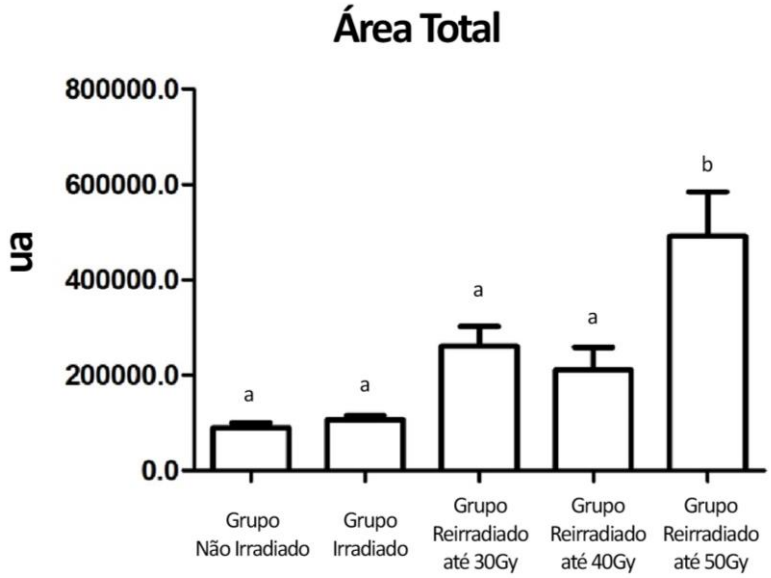
Figura 5. Gráfico com valor das áreas totais dos espectros para cada grupo e região analisada.



Essa tendência de aumento das áreas totais dos espectros indica a ocorrência de alterações estruturais e químicas consistentes dentro dessas amostras.

A análise estatística foi realizada a fim de mostrar o quão relevante foram essas alterações e permitiu observar que houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0,05$) (Figura 6), sendo que para o grupo reirradiado até 50Gy, ou seja, o que recebeu maior dose de radiação, essa alteração foi ainda maior e mais significativa.

Figura 6. Representação gráfica das medidas das áreas totais dos picos dos espectros. Valores expressos em unidades arbitrárias (ua). Letras diferentes significam diferença estatisticamente significante (p>0,005).

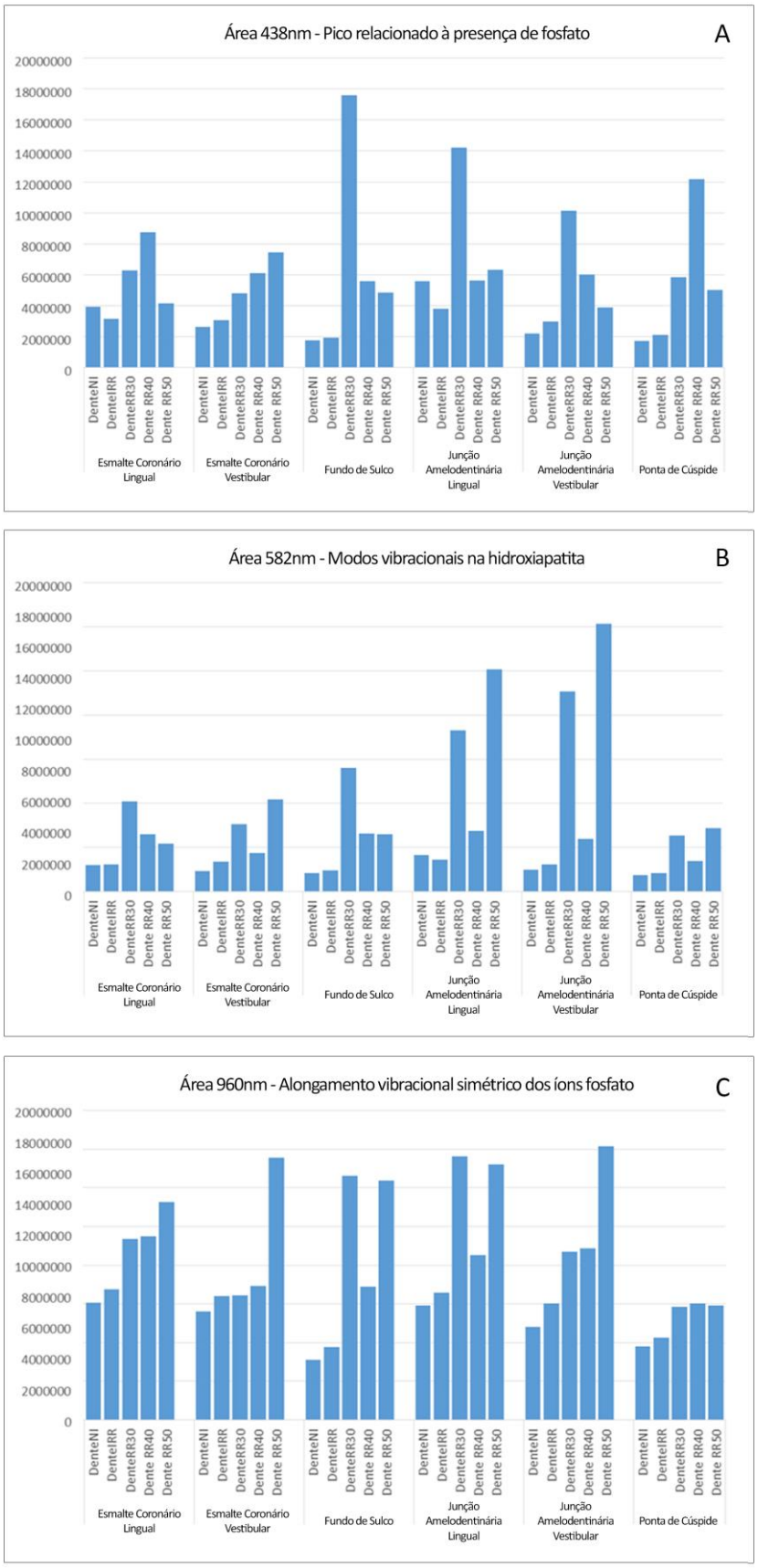


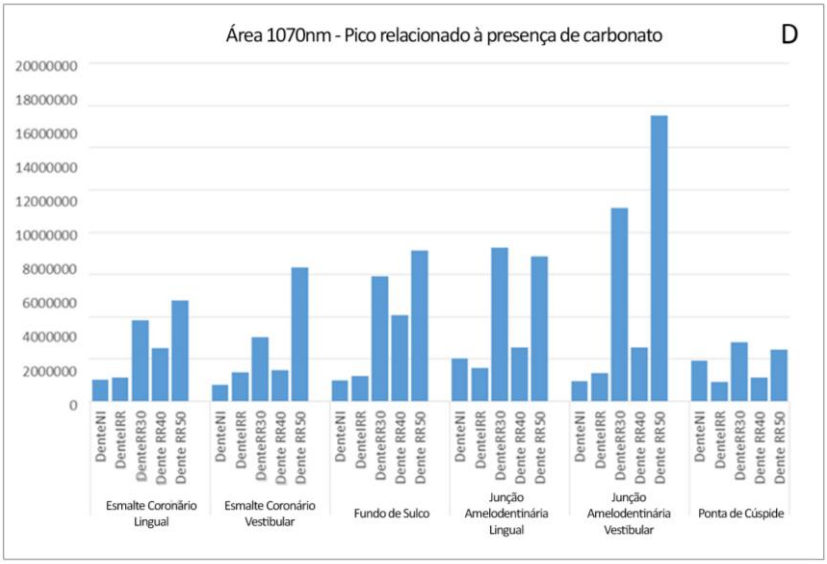
Cada pico representa a presença de uma certa vibração, dentro de uma molécula específica. Quanto mais presente é essa molécula, maior será a vibração encontrada e, portanto, maior o pico, que pode ser mensurado por sua intensidade e área. Porém, é importante ressaltar que não se pode fazer uma relação direta entre essas duas medidas, uma vez que o cálculo da área depende, não só da intensidade, mas também da largura (deslocamento) dos picos Raman. Por este motivo, no presente estudo, tanto a área (Figura 7) quanto a intensidade (Figura 9) de cada um dos picos de interesse foram analisados.

Ao analisar as áreas de cada um dos picos de interesse (Figura 7) foi possível observar, de maneira geral, uma tendência de aumento com o aumento da dose de radiação, o que indica a ocorrência de alterações estruturais e químicas nessas amostras. Tais mudanças foram mais evidentes nos dentes reirradiado e nas regiões de fundo de sulco e junção amelodentinária.

A análise estatística dos dados foi realizada, para cada um dos picos, a fim de mostrar o quão relevante foram essas alterações (Figura 8).

Figura 7. Valores das áreas para os picos selecionados em cada região, para cada um dos grupos de análise. Sendo: A – área do pico 438nm; B – área do pico 582nm; C – área do pico 960nm; D – área do pico 1070nm.





Ao analisarmos as áreas do pico relacionado a presença de fosfato (438nm), embora seja possível observar mudanças ocorridas entre os grupos, indicando possíveis alterações estruturais e químicas dentro das amostras relacionadas a esta substância, as alterações foram estatisticamente significantes apenas entre os dentes dos grupos não irradiado e o irradiado, em relação aos elementos reirradiados até dose de 30Gy ($p<0,05$) (Figura 8A).

Da mesma forma, em relação às áreas do pico relacionado aos modos vibracionais da hidroxiapatita (582nm), embora seja possível observar mudanças ocorridas entre os grupos, referente a esta substância, as alterações foram estatisticamente significantes apenas entre os dentes dos grupos não irradiado e irradiado, em relação elementos reirradiado até dose de 30Gy e 50Gy ($p<0,05$) (Figura 8B).

Por sua vez, a análise estatística, realizada a partir dos dados obtidos pelas áreas dos picos relacionados ao íon fosfato (960nm) e a presença de carbonato (1070nm), permitiu observar que houve diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$), sendo que tais alterações foram mais relevantes nos elementos reirradiados até 30Gy e 50Gy (Figura 8C e 8D).

Figura 8. Representação gráfica das medidas das áreas dos picos selecionados, para cada grupo da amostra. Valores expressos em unidades arbitrárias (ua). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significante (p>0,005).

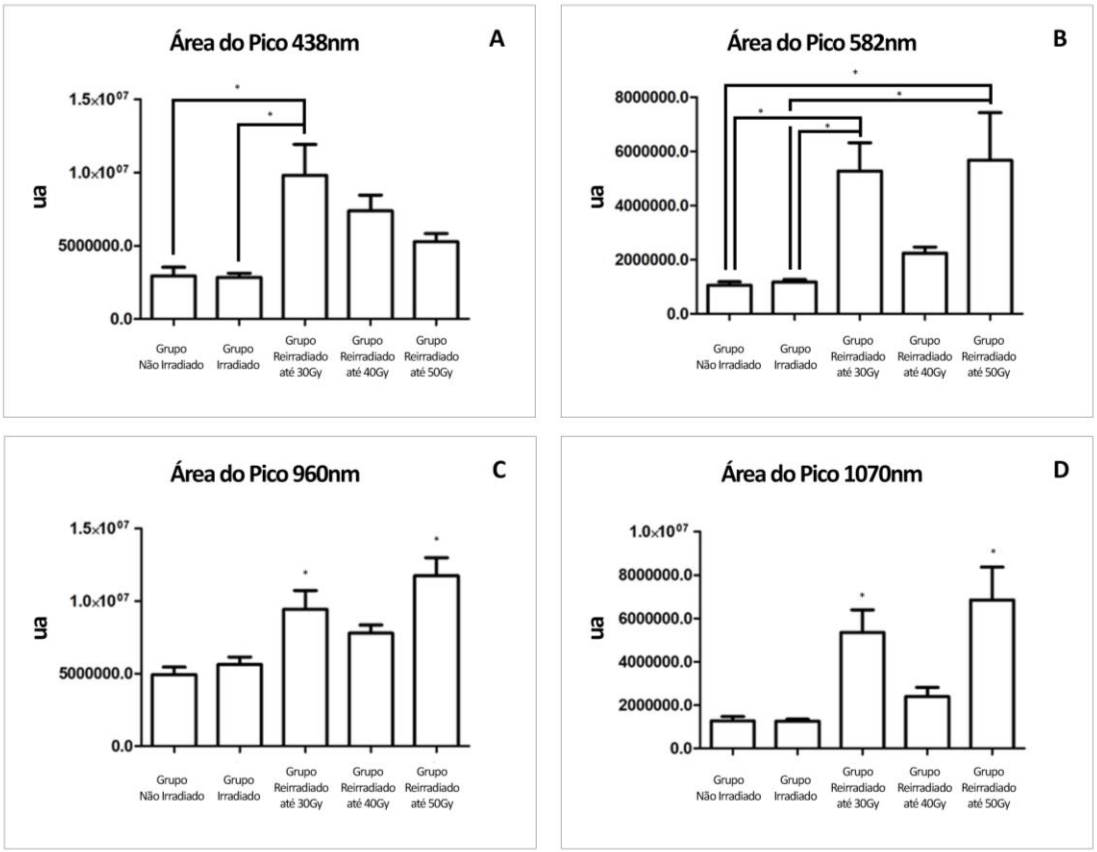
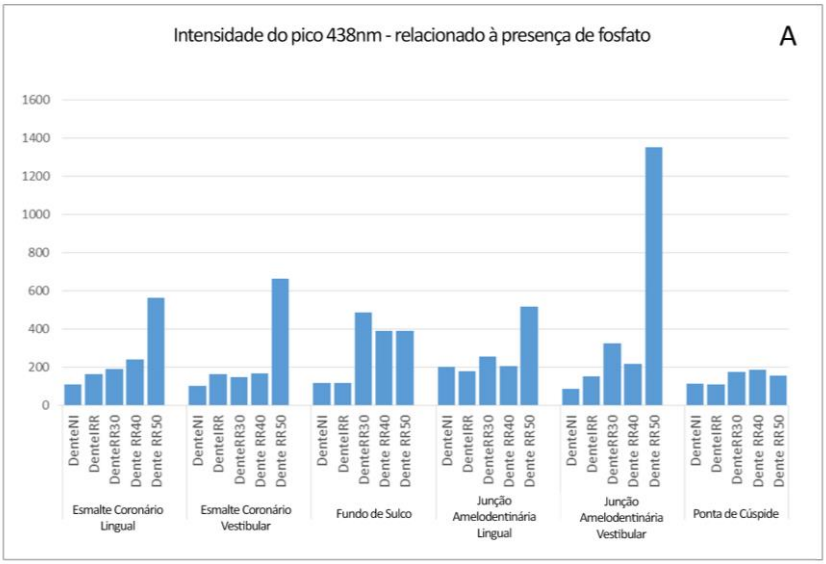
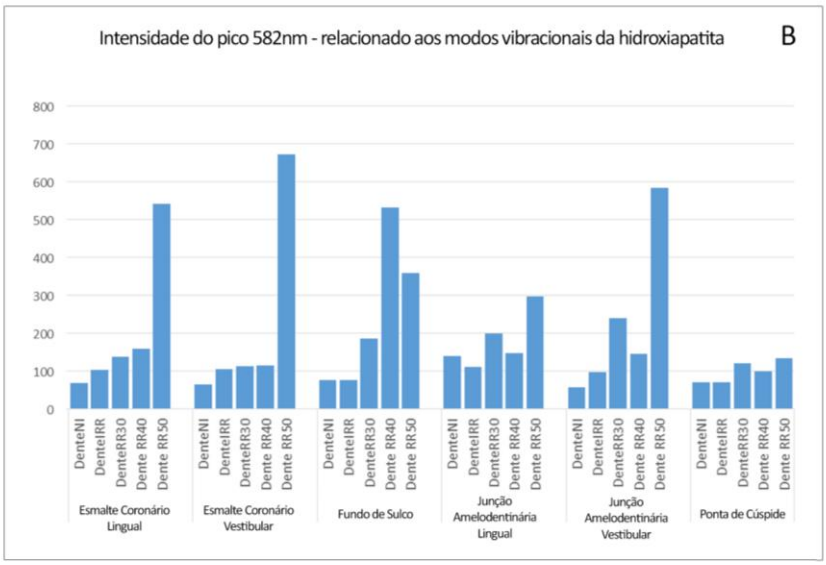
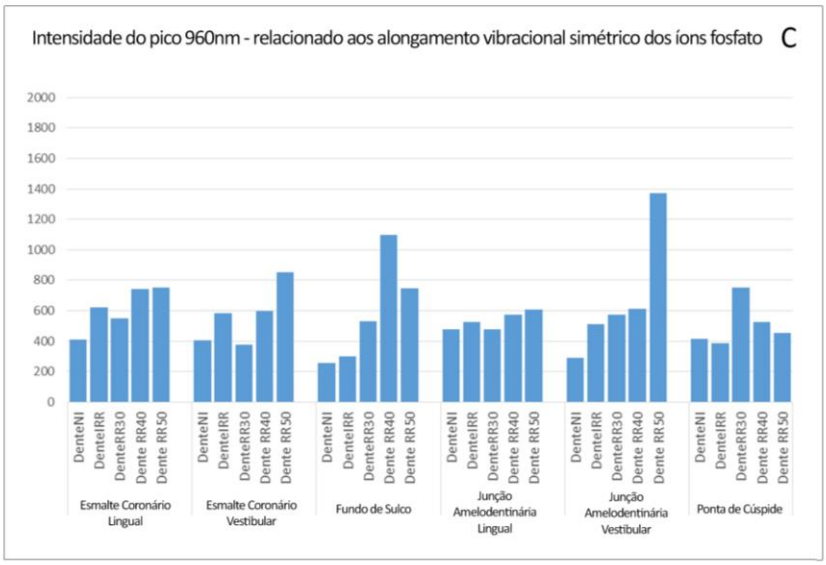
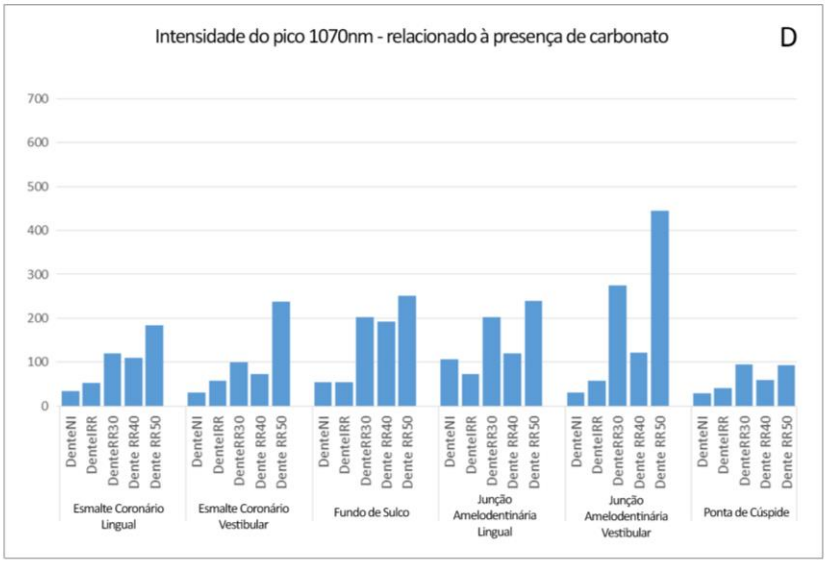


Figura 9. Valores das intensidades dos picos selecionados em cada região, para cada um dos grupos de análise. Sendo: A – área do pico 438nm; B – área do pico 582nm; C – área do pico 960nm; D – área do pico 1070nm.




Intensidade do pico 582nm - relacionado aos modos vibracionais da hidroxiapatita
B
800
700
600
500
400
300
200
100
0
DenteNI
DenteIRR
DenteRR30
Dente RR40
Dente RR50
Esmalte Coronário Lingual
Esmalte Coronário Vestibular
Fundo de Sulco
Junção Amelodentinária Lingual
Junção Amelodentinária Vestibular
Ponta de Cúspide


Intensidade do pico 960nm - relacionado aos alongamento vibracional simétrico dos íons fosfato
C
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
DenteNI
DenteIRR
DenteRR30
Dente RR40
Dente RR50
Esmalte Coronário Lingual
Esmalte Coronário Vestibular
Fundo de Sulco
Junção Amelodentinária Lingual
Junção Amelodentinária Vestibular
Ponta de Cúspide

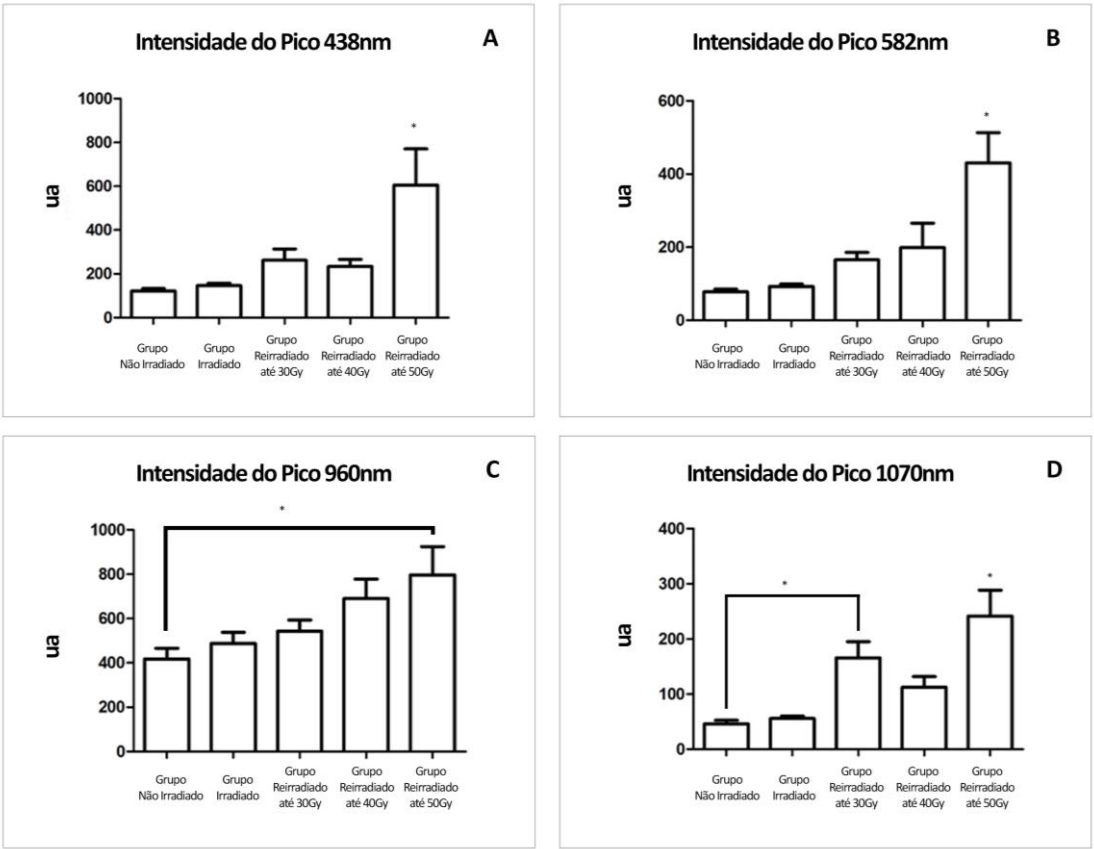

Intensidade do pico 1070nm - relacionado à presença de carbonato
D
700
600
500
400
300
200
100
0
DenteNI
DenteIRR
DenteRR30
Dente RR40
Dente RR50
Esmalte Coronário Lingual
Esmalte Coronário Vestibular
Fundo de Sulco
Junção Amelodentinária Lingual
Junção Amelodentinária Vestibular
Ponta de Cúspide

Ao analisarmos a intensidade do pico relacionado à presença de fosfato (438nm) e aos modos vibracionais da hidroxiapatita (582nm), os grupos apresentaram diferença estatisticamente significante entre si ($p<0,05$), sendo que os grupos com alterações mais relevantes foram os reirradiados até 30Gy e 50Gy (Figura 10A e 10B).

Por sua vez, a análise estatística realizada a partir dos dados obtidos pelas intensidades do pico relacionado ao íon fosfato (960nm) permitiu inferir que, embora seja possível observar mudanças ocorridas entre os grupos, indicando possíveis alterações estruturais e químicas dentro das amostras, essas alterações foram estatisticamente significantes apenas entre o grupo de dentes não irradiados em relação aos elementos reirradiados até dose de 50Gy ($p<0,05$) (Figura 10C).

Da mesma forma, em relação à intensidade do pico relacionado à presença de carbonato (1070nm), os dentes reirradiados até dose de 50Gy apresentaram diferenças estatisticamente significante quando comparados a todos outros grupos, assim como os elementos do grupo não irradiado, em relação elementos reirradiados até dose de 30Gy ($p<0,05$) (Figura 8B).

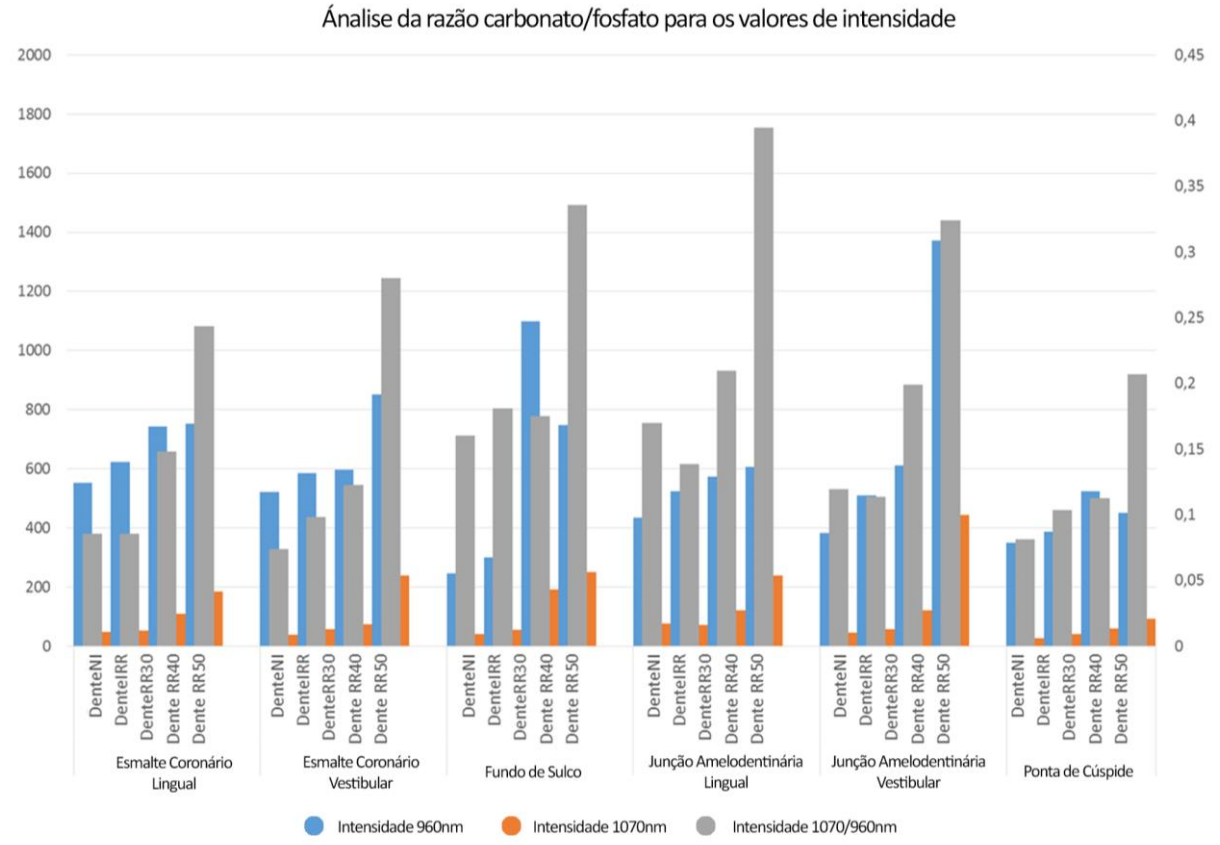
Figura 10. Representação gráfica das medidas das intensidades dos picos selecionados, para cada grupo da amostra. Valores expressos em unidades arbitrárias (ua). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significante ($p>0,005$).



Além da análise dos parâmetros espectrais isolados (área geral do espectro e intensidade e área dos picos Raman), correlacionar os parâmetros entre si nos permite observar uma consistência das mudanças encontradas e compreensão das alterações ocorridas na estrutura e composição química do tecido, como um todo.

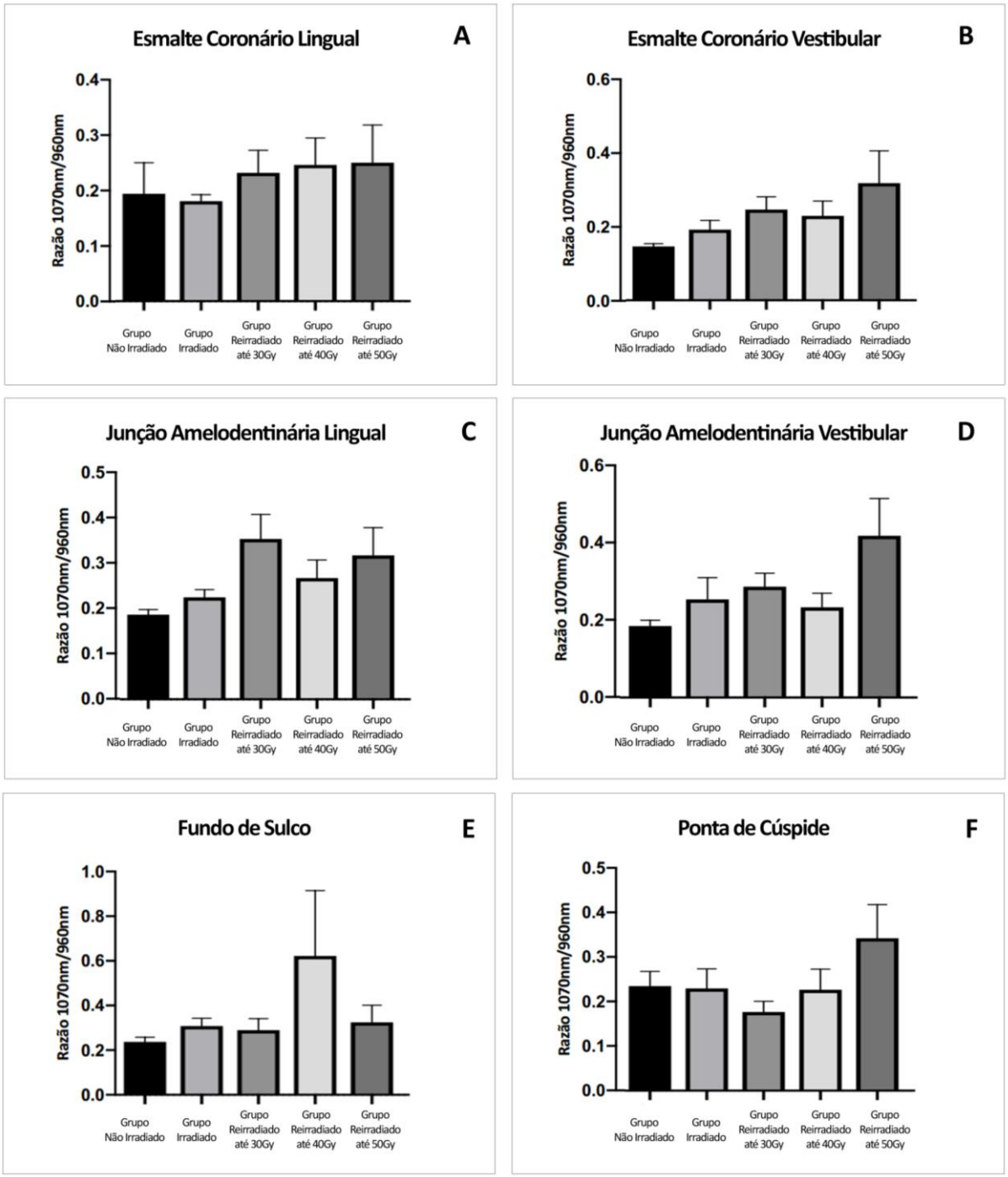
A análise da intensidade dos picos em 960nm (íons fosfato) e 1070nm (carbonato) entre si, demonstra uma tendência de aumento da razão carbonato/fosfato (1070/960) com o aumento das doses de radiação, durante processo de reirradiação, em todas as regiões analisadas (Figura 11).

Figura 11. Valor para a intensidade dos picos em 960nm, 1070nm e da razão (1070/960).



A análise estatística não demonstrou diferença estatisticamente significante entre as regiões ($p>0,05$) (Figura 12), o que demonstra que, independente da região analisada, a reirradiação não é mais danosa a uma região do que a outra, mas sim, atinge o dente como um todo.

Figura 12. Representação gráfica da razão (1070/960), para cada região e de acordo com cada grupo da amostra. Valores expressos em unidades arbitrárias (ua). Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significante (p>0,005).



4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV mostraram alterações morfológicas progressivas tanto no esmalte quanto na dentina, com o escalonamento das doses de radiação.

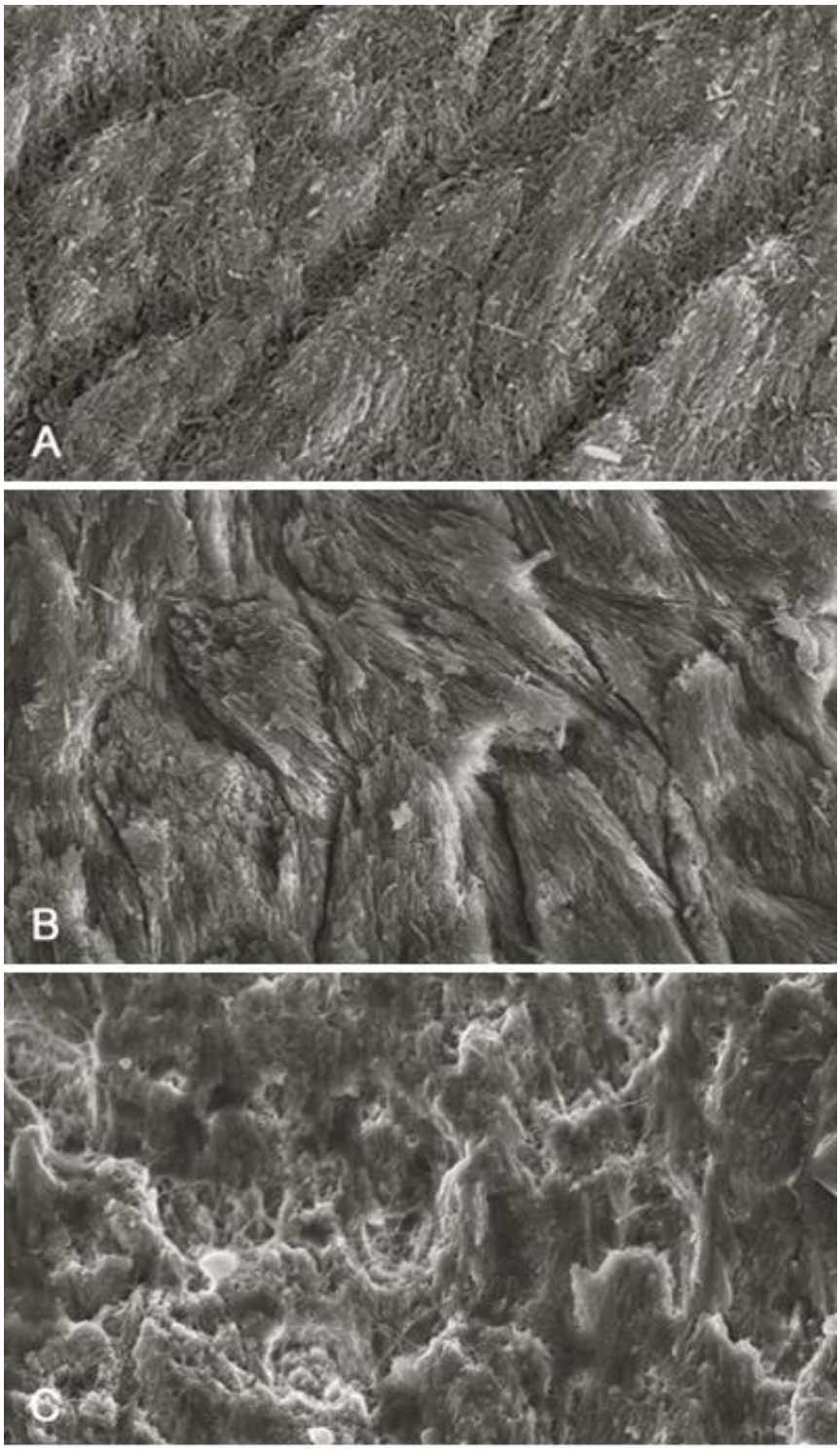
4.1.1 Esmalte

Por meio da análise morfológica do esmalte, foi possível observar que os dentes não irradiados apresentavam, ao serem analisados em secções transversais e oblíquas, em diferentes aumentos, prismas bem organizados, circundados por regiões interprismáticas (Figuras 10A e 11A).

Após irradiação (60Gy), verificou-se alterações na superfície desse tecido, em todas as regiões analisadas, nos diferentes aumentos. A porção interprismática tornou-se mais evidente, e, apesar dessas alterações, ainda foi possível observar e identificar os prismas e cristais de esmalte (Figuras 10B e 11B).

Após procedimento de reirradiação, com doses de 30Gy, 40Gy e 50Gy, de acordo com cada grupo, os espécimes apresentaram alterações morfológicas progressivas, conforme o aumento da dose de radiação, em todas as regiões do esmalte analisadas e nos diferentes aumentos, com perda da evidenciação da região interprismática e dificuldade de observação dos prismas e dos cristais (Figuras 10C-E e 11C-E).

Figura 13. Eletromicrografias do esmalte de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 5000x. (A): esmalte não irradiado com presença de prismas bem organizados e circundados pelas regiões interprismática; (B): esmalte irradiado até dose de 60Gy, com evidenciação da região interprismática, sem dificuldade na observação dos prismas e dos cristais; (C): esmalte reirradiado até a dose de 30Gy, (D): esmalte reirradiado até a dose de 40Gy, (E): esmalte reirradiado até a dose de 50Gy – alteração alterações morfológicas progressivas, com o escalonamento das doses de radiação, com perda da evidenciação da região interprismática e dificuldade de observação dos prismas e dos cristais.



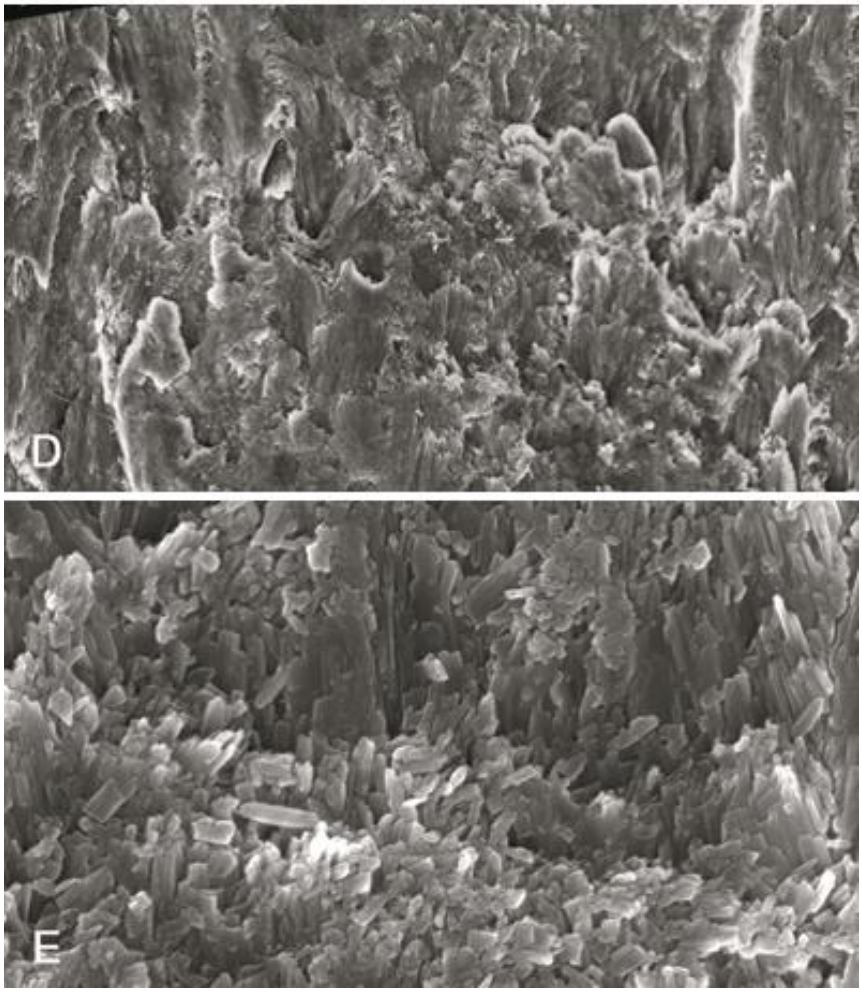
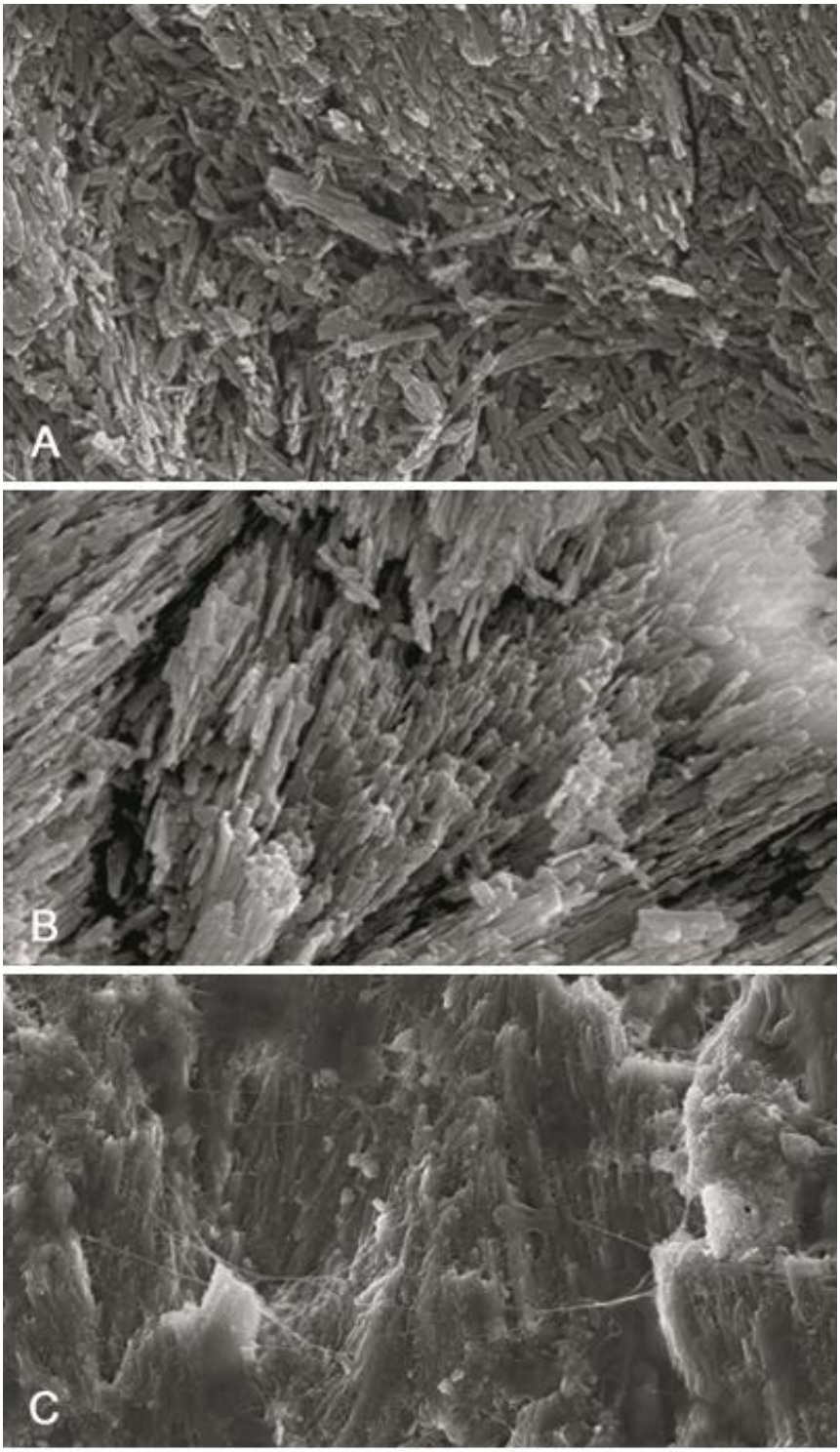
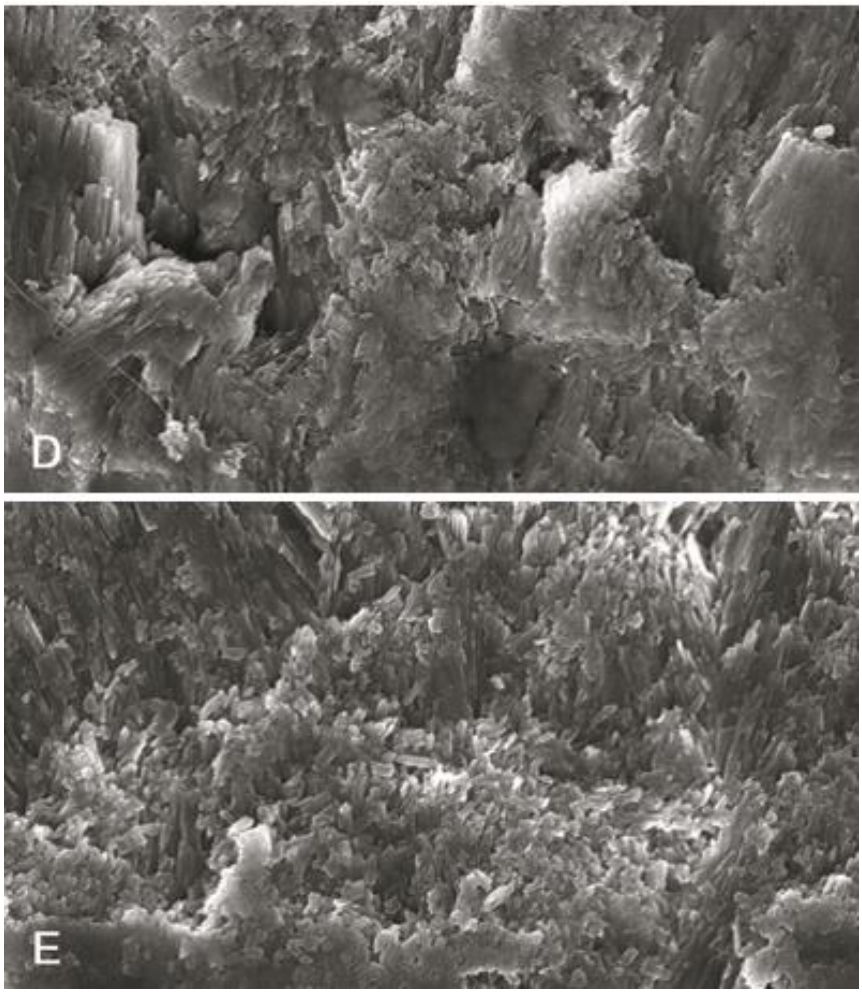

D
E

Figura 14. Eletromicrografias do esmalte de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 20000x. (A): esmalte não irradiado com presença de prismas bem organizados e circundados pelas regiões interprismática; (B): esmalte irradiado até dose de 60Gy, com evidenciação da região interprismática, sem dificuldade na observação dos prismas e dos cristais; (C): esmalte reirradiado até a dose de 30Gy, (D): esmalte reirradiado até a dose de 40Gy, (E): esmalte reirradiado até a dose de 50Gy – alteração alterações morfológicas progressivas, com o escalonamento das doses de radiação, com perda da evidenciação da região interprismática e dificuldade de observação dos prismas e dos cristais.




D
E

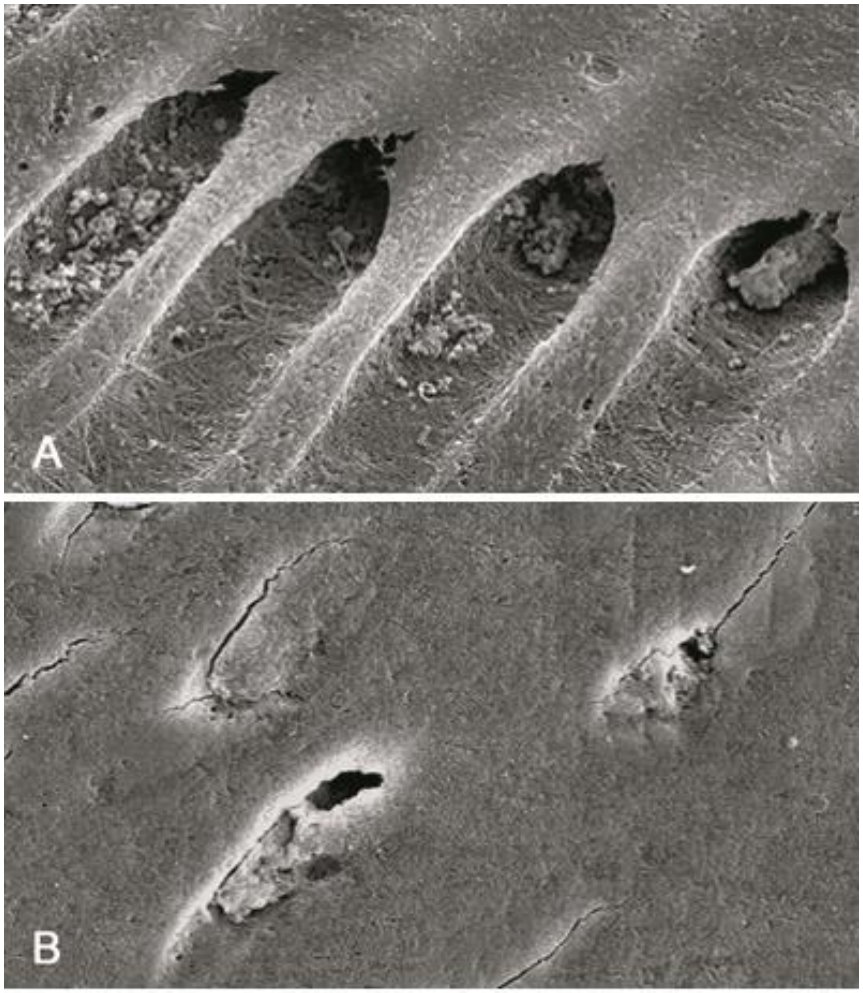
4.1.2 Dentina

Na análise morfológica da dentina, foi possível observar que os dentes não irradiados apresentavam túbulos dentinários bem definidos e rede de fibras colágenas bem organizadas (Figuras 12A e 13A).

Após irradiação (60Gy), em todas as regiões analisadas, nos diferentes aumentos, pode-se observar alteração da dentina intertubular, peritubular e intratubular, sendo que, no aumento de 20000x, verificou-se o aparecimento de fendas na estrutura dentinária e obstrução dos túbulos dentinários. Com relação as fibras colágenas, nota-se uma desestruturação das mesmas, sendo que no aumento de 20000x foi possível verificar sua fragmentação (Figuras 12B e 13B).

Após procedimento de reirradiação, com doses de 30Gy, 40Gy e 50Gy, de acordo com cada grupo, os espécimes apresentaram alterações morfológicas progressivas e ainda mais significativas, conforme o aumento da dose de radiação, com degradação da estrutura intertubular, peritubular e intratubular, presença de fendas em toda estrutura dentinária, obliteração dos túbulos e degradação da rede de fibras colágenas (Figuras 12C-E, 13C-E).

Figura 15. Eletromicrografias da dentina de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 5000x. (A): dentina não irradiada com presença de túbulos dentinários definidos e rede de fibras colágenas organizadas; (B): dentina irradiada até de 60Gy, com alteração da dentina intertubular, peritubular e intratubular; presença de fendas na estrutura dentinária e túbulos dentinários colabados e/ou destruídos; (C): dentina reirradiada até a dose de 30Gy, (D): dentina reirradiada até a dose de 40Gy, (E): dentina reirradiada até a dose de 50Gy – alterações morfológicas progressivas, com o escalonamento de dose de radiação, com degradação da estrutura intertubular, peritubular e intratubular, presença de fendas na estrutura, obstrução dos túbulos dentinários e degradação das fibras colágenas.



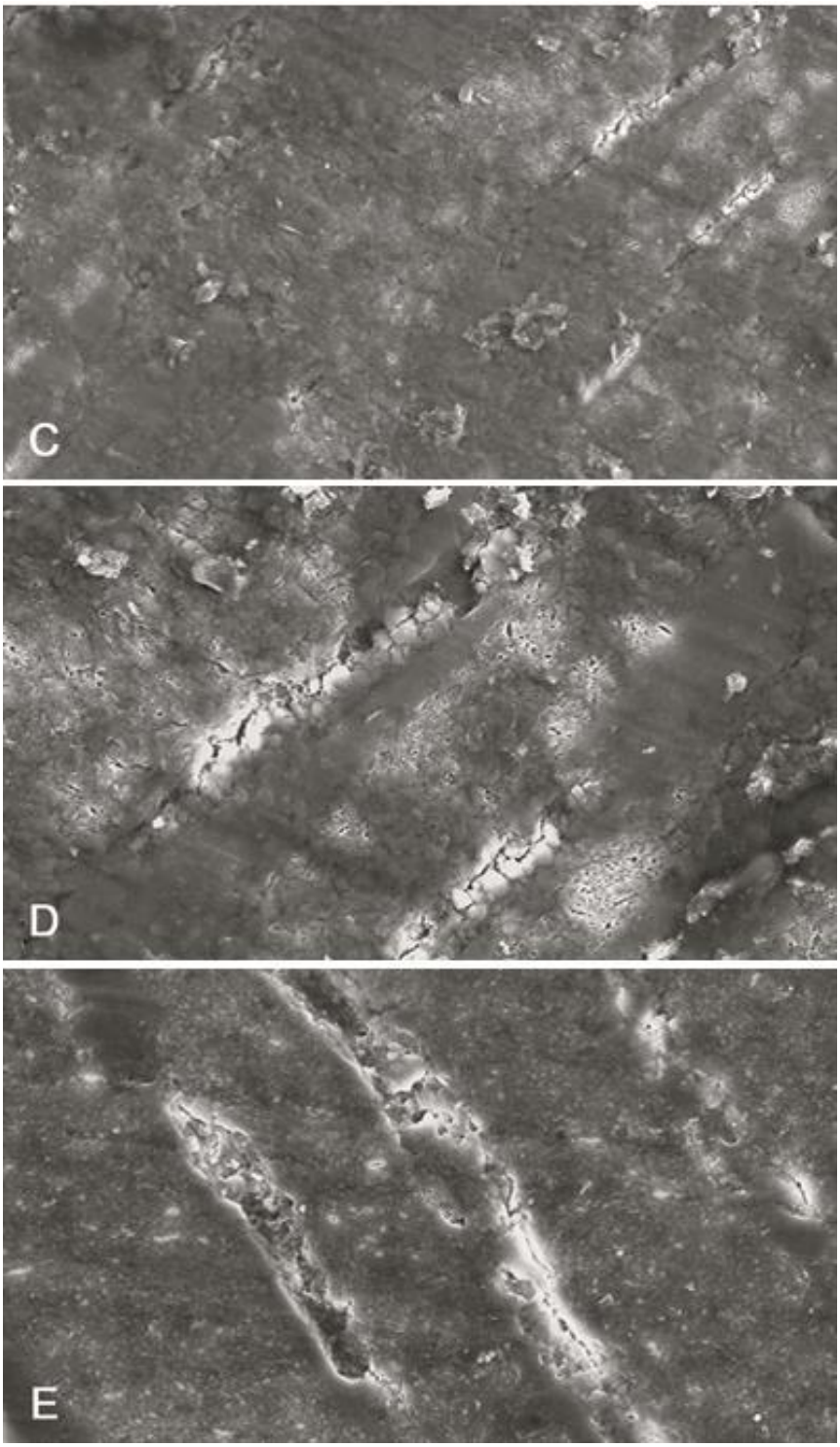
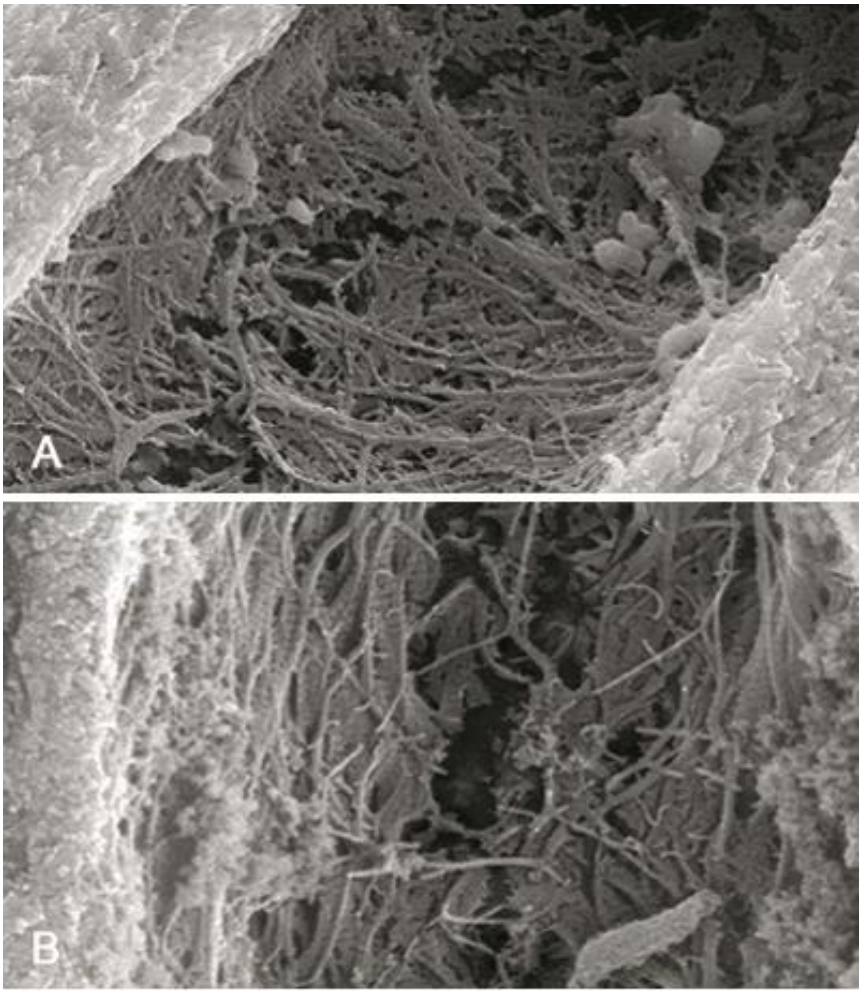
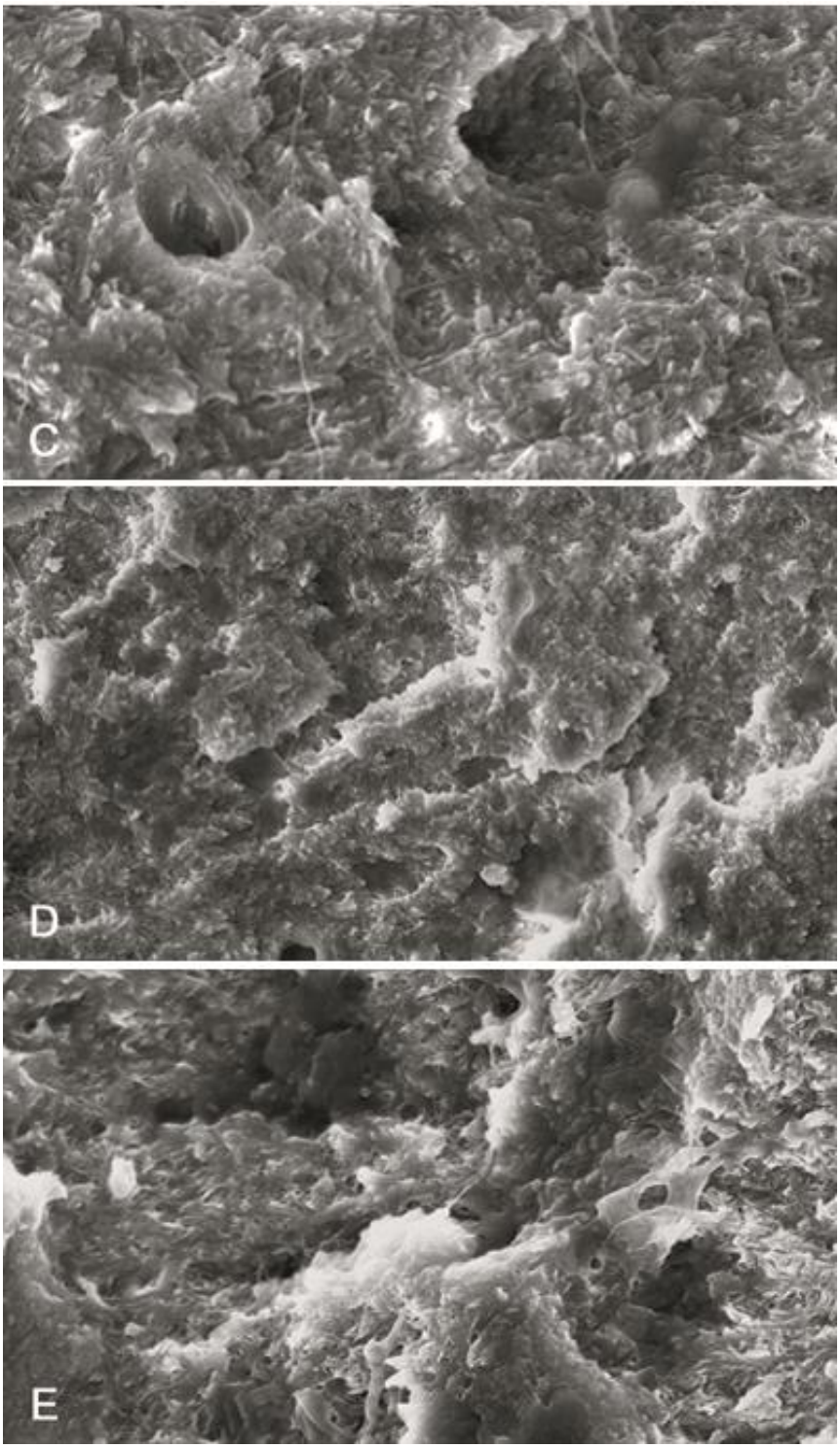

C
D
E

Figura 16. Eletromicrografias da dentina de dentes permanentes, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 20000x. (A): dentina não irradiada com presença de túbulos dentinários definidos e rede de fibras colágenas organizadas; (B): dentina irradiada até de 60Gy, com alteração da dentina intertubular, peritubular e intratubular; presença de fendas na estrutura dentinária e túbulos dentinários colabados e/ou destruídos; (C): dentina reirradiada até a dose de 30Gy, (D): dentina reirradiada até a dose de 40Gy, (E): dentina reirradiada até a dose de 50Gy – alterações morfológicas progressivas, com o escalonamento de dose de radiação, com degradação da estrutura intertubular, peritubular e intratubular, presença de fendas na estrutura, obstrução dos túbulos dentinários e degradação das fibras colágenas.




C
D
E

4.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

Na análise da composição e quantificação percentual dos íons por meio da Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX) foram analisadas as porcentagens dos elementos químicos oxigênio (O), fósforo (P) e cálcio (Ca) no esmalte e na dentina de dentes permanentes não irradiados, irradiados até de 60Gy e reirradiados até as doses de 30Gy, 40Gy e 50Gy.

As tabelas 3 e 4 apresentam o percentual médio os elementos químicos presentes no esmalte e na dentina, respectivamente, de dentes permanentes não irradiados, irradiados até dose de 60Gy e reirradiados até as doses de 30Gy, 40Gy e 50Gy.

Tabela 3. Percentual médio de elementos químicos presente no esmalte de dentes não irradiados, irradiados (60Gy) e reirradiados (30Gy, 40Gy e 50Gy).

ELEMENTOS QUIMICOS	ESMALTE NÃO IRRADIADO	ESMALTE IRRADIADO (60Gy)	ESMALTE REIRRADIADO (30Gy)	ESMALTE REIRRADIADO (40Gy)	ESMALTE REIRRADIADO (50Gy)
Oxigênio (O)	37,09	38,95	45,4	47,8	49,4
Fósforo (P)	19,13	18,55	14,5	13,5	13,5
Cálcio (Ca)	42,95	42,37	29,7	26,8	26,4

Tabela 4. Percentual médio de elementos químicos presente na dentina de dentes não irradiados, irradiados (60Gy) e reirradiados (30Gy, 40Gy e 50Gy).

ELEMENTOS QUIMICOS	DENTINA NÃO IRRADIADA	DENTINA IRRADIADA (60Gy)	DENTINA REIRRADIADA (30Gy)	DENTINA REIRRADIADA (40Gy)	DENTINA REIRRADIADA (50Gy)
Oxigênio (O)	36,47	38,05	40,8	44,5	45,3
Fósforo (P)	19,17	19,05	12,9	11,3	11,2
Cálcio (Ca)	42,83	42,56	25,9	22,7	22,06

De acordo com os dados obtidos, pode-se inferir que houve um discreto aumento na porcentagem de oxigênio, tanto no esmalte como na dentina após 60Gy de irradiação, quando comparado ao grupo não irradiado. O aumento dessa porcentagem se torna ainda mais evidente, quando comparados os grupos reirradiados até 30Gy, 40Gy e 50Gy com o grupo controle não irradiado.

Por outro lado, ao observarmos a porcentagem de fósforo e cálcio do esmalte e da dentina após 60Gy de irradiação, em comparação aos controles não irradiados, observamos uma ligeira diminuição desse valor. A diferença percentual é ainda maior quando comparamos a porcentagem de fósforo e cálcio dos grupos reirradiados até 30Gy, 40Gy e 50Gy com o grupo controle não irradiado.

Essa comparação fica ainda mais interessante ao compararmos o grupo irradiado (dose convencional de 60Gy) com o grupo reirradiado (novas doses de até 30, 40 e 50Gy), demonstrando que a reirradiação provoca danos ainda mais severos nas estruturas dentárias.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Metodologia

Com a finalidade de simular as condições clínicas de um tratamento radioterápico para CCP foi utilizada a radiação em acelerador linear com energia de 6MV, na dose/fração incremental de 2Gy/dia, respeitando os dois dias de descanso correspondentes ao final de semana, durante seis semanas, até atingir dose total de 60Gy. Este protocolo foi previamente utilizado na literatura por diferentes autores que avaliaram as estruturas dentais em trabalhos *in vitro* (JANSMA et al., 1988; JANSMA et al., 1990; PIOCH et al., 1992; KIELBASSA et al., 1997; AL-NAWAS et al., 2000; SPRINGER et al., 2005; SOARES et al., 2010; SOARES et al., 2011; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; SANTIN et al., 2015; MARTINS et al., 2015; MARTINS et al., 2018; QUEIROZ et al., 2019; ARID et al., 2020; MELLARA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020). Do ponto de vista clínico, há uma importante variabilidade na dose e volume irradiado em um determinado plano terapêutico, podendo caracterizar cada tratamento de forma individualizada e personalizada. A partir do planejamento radioterápico, realizado por sistemas de planejamento terapêutico (TPS), uma tomografia de planejamento é realizada e o plano estabelece o volume dos diferentes órgãos e a dose de radiação recebida por cada tecido adjacente ao volume alvo. Do mesmo modo, as doses durante a reirradiação são ainda mais complexas de serem determinadas, visto que há um acúmulo de dose, e, consequentemente, dos efeitos adversos esperados nestes tecidos irradiados. As doses empregadas em casos de retratamento locorregional de recidiva de CCP variam 30 a 50Gy e seguem o mesmo protocolo de dose-fração incremental de 2Gy/dia, respeitando os dois dias de descanso correspondentes ao final de semana, até atingir dose total de reirradiação definida (MAZERON et al., 2009; STOKER et al., 2013; NIEDER et al., 2013). Por este motivo, no delineamento experimental do presente estudo, determinamos grupos de dentes irradiados até 30, 40 e 50Gy.

Os efeitos da RT nas estruturas dentais dependem, entre outras coisas, da composição mineral e orgânica do esmalte e da dentina (GWINNETT, 1992). Estudos envolvendo dentes permanentes submetidos à RT mostraram que esta modalidade de tratamento é capaz de provocar mudanças na estrutura dental, tanto no esmalte (GONÇALVES, 2012; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; SANTIN et al., 2015; MARTINS et al., 2015; MARTINS et al., 2018; MARANGONI-LOPES et al., 2019; QUEIROZ et al., 2019; ARID et al.,

2020; MELLARA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020), quanto na dentina (FERGUSON et al., 2007; MCCAUL et al., 2012; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; KHAW et al., 2014; SANTIN et al., 2015; MARTINS et al., 2015; MARTINS et al., 2018; QUEIROZ et al., 2019; ARID et al., 2020; MELLARA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020), tais como: destruição da estrutura prismática do esmalte dentário (GRÖTZ et al., 1998; GONÇALVES et al., 2014; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014), redução nas propriedades mecânicas, como diminuição da microdureza (KIELBASSA et al., 1997; WALKER et al., 2011;), resistência à tração (SOARES et al., 2010), resistência ao desgaste (JERVOE, 1970) e resistência ao ataque de ácido (GRÖTZ et al., 1998), danos às fibrilas de colágeno (CHEUNG et al., 1990; GONÇALVES et al. 2014), resultando em uma redução significativa na dureza e elasticidade do tecido dentinário (FRÄNZEL E GERLACH, 2009;), aumento da solubilidade (MARKITZIU et al., 1986), atrofia dos processos odontoblásticos e obliteração de túbulos dentinários (KIELBASSA et al., 2000; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014) e redução da estabilidade da junção amelodentinária (KIELBASSA et al., 1997; SPRINGER et al., 2005; GONÇALVES et al., 2014; QUEIROZ et al., 2019; QUEIROZ et al., 2020).

Embora as alterações diretas da RT sobre as estruturas dentais sejam conhecidas, e impactem a integridade desses tecidos, ainda mais quando somadas as alterações indiretas como xerostomia, mucosite, mudanças de hábitos de alimentação e de higiene bucal em pacientes acometidos pelo CCP, não existe na literatura nenhum relato sobre a influência da RT nas propriedades químicas e morfológicas dos tecidos dentais em casos de pacientes submetidos à reirradiação após recidiva locorregional do CCP, sendo este então o objetivo deste trabalho de pesquisa.

Ao analisar as metodologias empregadas nestes estudos é possível verificar que não há uma padronização com relação ao tipo de substrato dental utilizado. Alguns estudos utilizam dentes humanos (JANSMA et al., 1993; KIELBASSA et al., 1999, KIELBASSA et al., 2000; AL-NAWAS et al., 2000; FRÄNZEL E GERLACH, 2009; SOARES et al., 2010; SOARES et al., 2011; DE SIQUEIRA MELLARA, 2011), outros dentes bovinos (JANSMA et al., 1988, JANSMA et al., 1990; PIOCH et al., 1992; KIELBASSA et al., 1997). Além disso, não existe padronização dos estudos em relação ao protocolo de radiação e as doses utilizadas (JANSMA et al., 1990; GRÖTZ et al., 1997; KIELBASSA et al.,1999; KIELBASSA, 2000; SPRINGER et al., 2005; SOARES et al., 2010; SOARES et al., 2011) e nem em relação ao tipo de estudo, *in vitro* (JANSMA et al., 1988; PIOCH et al., 1992; KIELBASSA et al., 1997; SPRINGER et al., 2005; SOARES et al.,

2010; DE SIQUEIRA MELLARA, 2011; SOARES et al., 2011; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; SANTIN et al., 2015; MARTINS et al., 2015; MARTINS et al., 2018; QUEIROZ et al., 2019; ARID et al., 2020; MELLARA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020), *in situ* (KIELBASSA et al., 1999; KIELBASSA et al., 2000) ou *in vivo* (AL-NAWAS et al., 2000). Por este motivo, a fim de padronizar e reproduzir o mais fielmente possível um retratamento radioterápico, para realização deste estudo foram utilizados dentes permanentes humanos e doses e protocolos já validados na literatura médica e odontológica (JANSMA et al., 1988; PIOCH et al., 1992; KIELBASSA et al., 1997; SPRINGER et al., 2005; SOARES et al., 2010; DE SIQUEIRA MELLARA, 2011; SOARES et al., 2011; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; SANTIN et al., 2015; MARTINS et al., 2015; MARTINS et al., 2018; QUEIROZ et al., 2019; ARID et al., 2020; MELLARA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020).

5.2. Esmalte

O esmalte dentário apresenta-se duro e friável devido ao alto conteúdo mineral. Ele é formado por 96% de material inorgânico em peso, associado a 4% de água e material orgânico. Não apresenta vitalidade e nem capacidade de neoformação; porém, podem ocorrer interações iônicas na cavidade bucal e mudanças em sua estrutura cristalina (FELSZEGHY, 2000; GASGA, 2001).

A porção mineral é composta por fosfato de cálcio cristalino e apatita, nas formas de hidroxiapatita, apatita carbonada ou apatita fluoretada (DE MENEZES OLIVEIRA et al., 2010). O fosfato e o cálcio são os elementos químicos que compõem a base desse tecido dental, porém, variações secundárias na sua composição podem ocorrer, podendo ser identificados elementos químicos como alumínio, bário, estrôncio e vanádio (GWINNETT, 1992; SALEH et al., 2004).

Apesar de quase todo o volume do esmalte ser ocupado por cristais de hidroxiapatita densamente organizados, o material orgânico presente neste tecido é responsável pela formação de uma fina rede entre os cristais. O corpo deste material orgânico é composto pelo polipeptídio amelogenina, rico em tirocina e fortemente ligado aos cristais de hidroxiapatita, e por proteínas não-amelogeninas (TEN-CATE et al., 2008).

Seus componentes inorgânicos são mais evidentes na superfície externa, enquanto os componentes orgânicos são normalmente encontrados em maiores volumes no interior

esmalte, próximo à junção amelodentinária (SETALLY AZEVEDO et al., 2014; DE MENEZES OLIVEIRA et al., 2010). O esmalte superficial é mais duro, denso e menos poroso. Dureza e densidade não apenas decrescem da superfície em direção ao interior, mas também da cúspide ou borda incisal em direção à margem cervical (BERKOVITZ et al., 2004; TEN CATE, 2001). Toda estrutura deste tecido é organizada em prismas, cuja orientação determina o comportamento anisotrópico do esmalte e influencia suas propriedades mecânicas (URABE et al., 2000; GIANNINI et al., 2004).

Os prismas são formados por cristais de hidroxiapatita orientados da junção amelodentinária para a superfície. O espaço entre os cristais é ocupado por água e material orgânico (BERKOVIT et al, 2004). A estrutura molecular do cristal de hidroxiapatita do esmalte contém aproximadamente 2 a 3% de carbonato, que é incorporado durante o seu o desenvolvimento e afeta, diretamente, a sua estabilidade química e a estrutura física (NELSON, 1981).

A apatita é um fosfato de cálcio que possui estrutura hexagonal formada por um sítio tetraédrico (PO_4^{-3}) que está ligado ao cálcio em dois sítios estruturais diferentes. Ela é formada por um padrão definido de arranjo iônico que permite considerável variação na sua composição por meio da substituição, troca e adsorção de íons (TEN CATE, 2001). As variantes mais frequentes de apatita são: fluorapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$) e hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$). As substituições dentro da rede cristalina da apatita ocorrem com frequência e possuem um número elevado de combinações. (DUGGAL et al., 1991). Tais substituições podem acontecer de forma rápida ou lenta, podendo durar anos, e dependem de fatores como: desgaste, difusão de íons através da saliva, oxidação, decomposição e precipitação (REITZNEROVÁ et al., 2000; FEJERSKOV e KIDD, 2005). Além disso, elas podem alterar a cristalinidade, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da hidroxiapatita (a substituição da hidroxila por fluoretos diminui a solubilidade dos cristais, enquanto que a substituição pelo carbonato aumenta a solubilidade). Esse padrão de variabilidade iônica reflete o meio ambiente, podendo ser usado clinicamente para modificar a estrutura dos cristais (MAVROPOULOS, 1999).

A maior suscetibilidade à fratura de esmalte e a ocorrência de lesões de cárie relacionadas à radiação são duas das complicações mais significativas em pacientes com CCP submetidos à RT (KIELBASSA et al., 2006). Uma revisão sistemática realizada por Moore et al. (2020) investigou a incidência de cárie dentária pós-radioterapia em pacientes com CCP. Os

resultados indicaram que esta doença acomete aproximadamente 29% dos pacientes e 37% deles possui um risco maior de desenvolver este tipo de lesão dentro de dois anos da realização do tratamento. Uma revisão sistemática anterior de Hong et al. (2010) determinou uma prevalência geral ponderada de cárie dentária em sobreviventes de câncer pós-tratamento de 28,1%. Em outros estudos foi demonstrado que a susceptibilidade à cárie dentária pós-radiação persiste a longo prazo (SIALA et al., 2014; DHOLAM et al., 2013).

Os fatores preditivos da "cárie relacionada à radiação" são a alteração na qualidade e na quantidade de saliva, devido à hipofunção da glândula salivar (VISSINK et al., 2003; KIELBASSA et al., 2006), dificuldade em realizar uma higiene bucal adequada em função do desenvolvimento de mucosites e da rigidez muscular, aumento do consumo de alimentos cariogênicos e alterações da microbiota bucal (KIELBASSA et al., 2006; SILVA et al., 2009; LIESHOUT e BOTS, 2014). Porém, os efeitos diretos na estrutura dental (esmalte e dentina) também podem predispor à maior susceptibilidade ao desenvolvimento da "cárie relacionada à radiação". Walker et al. (2011) e Liang et al. (2016) investigaram os efeitos da dose de radiação dentária no tecido dental mineralizado. Em estudos retrospectivos de pacientes submetidos ao tratamento radioterápico de cabeça e pescoço verificou-se que os dentes expostos a mais de 60Gy eram mais propensos à danos, definidos como perda de esmalte moderada a severa, quando comparados a dentes não expostos (WALKER et al., 2008; WALKER et al. 2011).

No presente estudo, após o primeiro ciclo de radiação com dose total 60Gy, observou-se alterações morfológicas na estrutura do esmalte em comparação à amostra não irradiada, com evidenciação da porção interprismática. Nos espécimes reirradiados, com o escalonamento de dose de radiação, as alterações se tornaram ainda mais evidentes, não sendo mais possível observar a região interprismática, nem identificar os prismas e cristais de esmalte, o que vai de acordo com o sugerido por WALKER et al. (2008) e WALKER et al. (2011).

A alteração da estrutura prismática do esmalte dental após irradiação com dose única ou cumulativa, *in vitro,* de 1M-rad*,* foi verificada pela primeira vez por Jervoe, em 1970, o qual observou mudanças na estrutura cristalina do esmalte de dentes humanos. Essas alterações possivelmente se deram, segundo o autor, devido ao efeito da radiação dentro da estrutura do cristal. Nesta análise, é importante ressaltar que a dose utilizada por Jervoe (1970) neste estudo é incompatível com a vida. No presente trabalho, utilizamos doses

menores e fracionadas, seguindo as diretrizes estabelecidas para tratamento do CCP. Grotz et al., em 1998, realizaram um estudo avaliando as alterações do esmalte dental humano *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, após diferentes doses de radiação, e verificaram alterações micromorfométricas no esmalte irradiado. A despeito de diferenças relacionadas à dose de irradiação e à metodologia empregada, nossos resultados concordam com os dados obtidos por estes autores, uma vez que também foi possível observar alterações micromorfológicas após irradiação. Porém, nos espécimes reirradiados, com o escalonamento de dose de radiação, essas alterações foram mais severas e cumulativas, sendo que ao final do procedimento de reirradiação, não foi mais possível observar a região interprismática, nem identificar os prismas e cristais de esmalte.

Em 1976, Zach avaliou os efeitos da radiação com dose única de 12000rads, sobre dentes humanos, por meio de difração de raios-X, e não verificou alterações na cristalinidade. Jansma et al. (1988) avaliaram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, o efeito da irradiação (seguindo protocolo de 2Gy, durante 12 dias, até total de 72Gy), sobre o esmalte dental bovino e também não verificaram alterações na estrutura cristalina do esmalte, sugerindo que a radiação não apresentasse efeitos diretos na estrutura inorgânica de dentes humanos, e que as alterações dentais observadas eram consequências das mudanças na matriz orgânica desse tecido, e não na matriz inorgânica do esmalte.

Em 2016, por meio de uma análise qualitativa e quantitativa obtida por microscopia de luz polarizada, Troconis (2016) demonstrou que o esmalte cervical era a estrutura mais frequentemente afetada pela RT. Segundo o autor, a detecção de padrões reduzidos de birrefringência em esmalte cervical das amostras irradiadas *in vivo* poderiam indicar alterações que poderiam levar ao aparecimento de lesões de cárie relacionadas à radiação. Outros estudos utilizando diferentes abordagens metodológicas, incluindo a microscopia óptica, microscopia de luz polarizada, microscopia eletrônica de varredura, tomografia de coerência óptica e, mais recentemente, microtomografia, também detectaram este padrão de desmineralização do esmalte em dentes irradiados (SILVA et al., 2009; DE OLIVEIRA MOTA et al., 2013; MORAIS-FARIA et al., 2015).

O termo espectroscopia é utilizado para designar toda técnica de obtenção de dados físico-químicos por meio da transmissão, absorção ou reflexão da energia incidente em uma amostra. As técnicas espectroscópicas são constantemente utilizadas na identificação, caracterização e elucidação de estruturas de moléculas e compostos, bem como no

monitoramento e controle de reações químicas e se fundamentam na propriedade que os átomos e moléculas têm de absorver ou emitir energia em uma determinada região do espectro eletromagnético, o que oferece informações sobre a composição química e estrutura cristalina da amostra. Além disso, tais técnicas são utilizadas como método de análise de elementos simples da estrutura química de compostos inorgânicos ou grupos funcionais de uma substância orgânica, utilizando radiação eletromagnética. Existem diversos métodos de análises espectroscópicas, tanto moleculares quanto atômicos. Os três principais são: espectroscopia de absorção (correlaciona a quantidade da energia absorvida em função do comprimento de onda da radiação incidente), a espectroscopia de emissão (analisa a quantidade de energia emitida por uma amostra contra o comprimento de onda da radiação emitida) e a espectroscopia de espalhamento (determina a quantidade da energia espalhada (dispersa) em função de parâmetros como o comprimento de onda e ângulo de incidência) (TORRES, 2008).

A espectroscopia Raman é uma técnica de espalhamento baseada no Efeito Raman, descoberto e publicado em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman. Em uma descrição breve, ela se baseia no espalhamento por meio da interação das moléculas de uma amostra com uma luz monocromática eletromagnética. Nessa interação, os fótons incidentes excitam a molécula que está inicialmente em um nível vibracional do estado eletrônico fundamental para um estado intermediário, do qual ela se recupera após 10 a 14 segundos (SALA et al., 2008). Tais espectros exibem uma maior riqueza de detalhes sobre o material analisado quando comparado aos espectros eletrônicos, pois baseiam-se em espectros únicos de cada material e das moléculas que o constituem, enquanto que os espectros eletrônicos são constituídos por bandas largas e deformadas (SALA et al., 2008).

A espectroscopia Raman foi a técnica escolhida para o desenvolvimento deste trabalho por se tratar de uma técnica vibracional não-destrutiva, de alta precisão e sensibilidade e que permite a caracterização simultânea da matéria orgânica e inorgânica do dente (YUANYUAN; HSU, 2007). Além disso, pode ser aplicada como método de análise qualitativo e quantitativo de sistemas inorgânicos e orgânicos, podendo ser utilizada na detecção de doenças como a cárie, em seu estágio inicial de desenvolvimento (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Ribeiro et al. (2001), utilizaram a espectroscopia Raman para diagnóstico de lesões cariosas em tecidos dentários. As medições realizadas em 70 amostras revelaram

características específicas dos espectros de tecidos cariados, quando comparados a tecidos hígidos, principalmente a nível da banda principal de fosfato a 960nm.

Ko et al. (2005), combinaram Tomografia de Coerência Óptica (TCO) com espectroscopia Raman visando a detecção e caracterização de lesões iniciais de cárie. Os resultados obtidos por TCO revelaram um aumento de fluorescência nas amostras cariadas e foram suportados pelos resultados obtidos pelo Raman, em que se constataram mudanças no pico de fosfato (960nm), atribuídas ao fato do processo de desmineralização capaz de provocar alterações na conformação da estrutura cristalina. Outros estudos também demonstraram que, por meio do pico de fosfato, é possível determinar se o tecido encontra-se íntegro ou não (Ko et al., 2006). Sowa et al. (2007), reafirmaram tais conclusões e frisaram a precisão, repetibilidade e reprodutibilidade do método. Em 2008, novos estudos com o objetivo de simplificar e agilizar o processo de análise, desenvolveu um sistema constituído por um espectrômetro acoplado a uma fibra óptica capaz de recolher os dados das polarizações simultaneamente. Ao desenvolverem este sistema, a viabilidade e possibilidade de ele ser implementado em estudos *in vivo* e até, no futuro, na prática clínica aumentaram (Ko et al., 2008). No mesmo ano, Bulatov et al., realizaram um mapeamento de amostras com diversos tipos de lesões no esmalte. Tais amostras foram submetidas à espectroscopia de Raman e os resultados revelaram que as características espectrais e morfológicas obtidas são diferentes para o tecido hígido, zonas brancas opacas, zonas acastanhadas e zonas cavitadas, reforçando os diferentes estágios de progressão da lesão. Os diferentes estágios das lesões provocam mudanças nos parâmetros espectrais como: intensidade, posição e largura dos picos Raman (RIBEIRO et al., 2001).

De acordo com a revisão sistemática realizada por Rodrigues e Galzerani em 2012, por meio desta técnica foi possível compreender fenômenos que, anteriormente, só eram estudados na teoria, destacando-a por ser um método não destrutivo, rápido e versátil. Com base nesses achados, em 2015, Coello et al., desenvolveram um método de diagnóstico quantitativo direto por meio da espectroscopia Raman. O objetivo era detectar mudanças moleculares específicas nos tecidos mineralizados e estabelecer um padrão de normalidade. Após a aquisição dos espectros, foram propostos dois índices de mineralização (fosfato a 438nm e 960nm) estabelecido um padrão de normalidade. A fim de comprovar o sucesso dessa metodologia, a mesma foi aplicada a dois casos onde as lesões presentes não podiam ser detectadas por métodos de diagnóstico tradicionais, como a radiografia, e os resultados

foram satisfatórios. Além disso, além da possibilidade da mensuração dos índices de mineralização relacionados aos espectros do fosfato (438nm e 960nm), por meio do método é possível obter informações sobre os compostos presentes na molécula de hidroxiapatita (espectro 582nm) (RIBEIRO et al., 2001; SCHULZE et al., 2004; YUANYUAN e HSU, 2007; GILCHRIST et al., 2007), que contem aproximadamente 2 a 3% de carbonato (espectro 1070nm), substância diretamente responsável pela estabilidade química e a estrutura física dos cristais (NELSON, 1981).

Mudanças na estrutura e na composição das amostras são observadas, por meio da espectroscopia Raman, pelo aparecimento ou desaparecimento de um determinado pico ou pelo aumento ou redução da sua intensidade e/ou área. Cada pico representa a presença de uma certa vibração, dentro de uma molécula específica. Quanto mais presente é essa molécula, maior será a vibração encontrada e, portanto, maior será o pico Raman, que pode ser mensurado por sua intensidade e área. Porém, é importante ressaltar que não se pode fazer uma relação direta entre essas duas medidas, uma vez que o cálculo da área depende não só da intensidade, mas, também, da largura (deslocamento) dos picos Raman. Por esse motivo, a análise de todos os parâmetros envolvidos, como a área geral dos espectros e a área e intensidade cada um dos picos de interesse, bem como a correlação dos dados entre si, é fundamental para se obter resultados mais próximos a realidade.

Além disso, embora este método não quantifique as mudanças ocorridas, ele consegue fornecer padrões de mudanças capazes de indicar a ocorrência de alterações dentro dessas amostras. Toda mudança no espectro é reflexo de uma alteração ocorrida na estrutura e/ou composição química do tecido, como um todo, e quando identificamos essas alterações em diferentes parâmetros de análise (individuais e/ou comparativos) demonstramos a consistência das mudanças observadas. A análise estatística dos dados numéricos obtidos neste processo, acaba funcionando como um complemento e permite avaliarmos o quão relevante são essas alterações.

Ao realizarmos a análise e a correlação dos dados obtidos no presente estudo, pôde-se observar que a reirradiação provocou mudanças em relação aos níveis de energia vibracional das moléculas presente no esmalte dentário e, consequentemente, mudanças nos parâmetros espectrais (intensidade e largura dos picos Raman), alterando as áreas totais dos espectros como um todo. Isso demonstra que a radioterapia provoca alterações estruturais e químicas consistentes no esmalte de dentes permanentes, sendo que nos elementos

reirradiados, ou seja, que receberam maior dose de radiação, essa alteração foi ainda mais significativa.

Os dados obtidos por meio da análise da área e intensidade dos picos referente ao fosfato (438nm – presença de fosfato; 960nm – vibração dos íons fosfato) funcionam como índices diretamente relacionados com o grau de mineralização da amostra. As alterações encontradas nestes parâmetros, para este pico de interesse, demonstram que a RT é capaz de afetar o conteúdo mineral do dente e provocar alterações na conformação da estrutura cristalina, uma vez que houve uma variação em relação aos níveis de energia vibracional dessas moléculas, ainda mais severa nos espécimes reirradiados.

Ao analisarmos a área e a intensidade dos picos referente à estrutura e composição química da hidroxiapatita (pico 582nm) e a presença do carbonato (pico 1070nm), bem como a relação carbonato/fosfato, os resultados sugerem a ocorrência do processo de substituição da hidroxila da hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$) pelo carbonato, com consequente aumento da solubilidade do esmalte dental e dissolução dos cristais de esmalte, favorecendo o processo de desmineralização. Além disso, substituições como esta, dentro da rede cristalina da apatita, também são capazes de alterar a cristalinidade, as dimensões dos cristais, a textura superficial e a estabilidade da estrutura da hidroxiapatita, provocando danos a este tecido que são ainda mais severos com o processo de reirradiação.

Além disso, análise da intensidade dos picos em 960nm (íons fosfato) e 1070nm (carbonato) entre si, demonstra uma tendência de aumento da razão carbonato/fosfato (1070/960) com o aumento das doses de radiação, durante processo de reirradiação, em todas as regiões analisadas, o que demonstra que, independente da região analisada, a reirradiação não é mais danosa a uma região do que a outra, mas sim, atinge a estrutura dentária como um todo.

No presente estudo, as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram evidenciar maiores alterações na região interprismática, a qual corresponde a matriz orgânica do esmalte, nas amostras reirradiadas. Esta área exibiu um padrão altamente poroso e desorganizado, indicando uma alteração morfológica progressiva do esmalte, conforme as doses de radiação foram aumentando, como sugerido em outros estudos *in vitro* já realizados (SOARES et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014; TROCONIS, 2016).

De acordo com Baker (1982) a radiação, por ocasionar, diretamente, alterações nas ligações proteicas, é capaz de influenciar mais intensamente a região interprismática do esmalte, na qual se concentra seu conteúdo orgânico, do que a região prismática. Além disso, na região interprismática do esmalte há também uma concentração de água (TEN-CATE et al., 2008). Estudos anteriores especulam que a RT altera a matriz orgânica do esmalte (JANSMA et al., 1988; GONÇALVES et al., 2014). A radiação ionizante, é capaz de agir indiretamente por meio da sua interação com as moléculas de água, resultando na produção de radicais livres instáveis e altamente reativos ou de espécies reativas de oxigênio, que podem reagir com biomoléculas (componentes orgânicos) produzindo danos teciduais e celulares (FANG et al., 2002). No presente trabalho as alterações no esmalte atingiram principalmente a região interprismática.

Por meio da espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX), o conteúdo mineral do esmalte dos dentes permanentes foi quantificado percentualmente no presente estudo, com auxílio de microanálise, a fim de observar o comportamento de alguns elementos como o oxigênio, o fósforo e o cálcio. A razão Ca/P em peso e a razão molar Ca/P determinam a taxa de mineralização da hidroxiapatita, um parâmetro importante, pois tanto as propriedades mecânicas do substrato dentário quanto sua taxa de biodegradação dependem fortemente dele (SLOSARCZYK et al., 1999).

No esmalte irradiado, após a dose de 60Gy, observou-se um discreto aumento na quantidade de oxigênio e uma pequena diminuição nas quantidades de fósforo e cálcio. Estas variações tornaram-se ainda maiores e mais evidentes ao analisarmos os espécimes reirradiados. A diminuição da quantidade de cálcio e fósforo, observada no presente estudo, pode ser devido a modificações na solubilidade do esmalte dental após irradiação. Este tecido mais solúvel perderia íons para o meio (saliva artificial). Porém, o aumento da solubilidade do esmalte não foi observado por Joyston-Bechal (1985) e por Jansma et al. (1988), os quais verificaram a diminuição da desmineralização subsuperficial do esmalte após irradiação, e atribuíram esse acontecimento à diminuição da solubilidade. Em 1990, Jansma et al. realizaram um outro estudo onde verificaram que a irradiação não modificou a permeabilidade do esmalte, e atribuíram as modificações químicas da fase inorgânica do esmalte, às alterações na diminuição da desmineralização sub superficial após irradiação. Dessa forma, outra explicação para a diminuição dos conteúdos de cálcio e fósforo no presente estudo, poderiam ser as modificações químicas da fase inorgânica do esmalte após

irradiação. Ainda, de acordo com Jervoe (1970), a radiação é capaz de ocasionar alterações químicas nos cristais devido à radiólise. De acordo com Driessens e Verbeek (1989), os cristais de apatita do esmalte dental incorporam sódio, carbonato e magnésio durante a sua formação e a irradiação, segundo Jansma et al. (1990), provavelmente ocasionaria defeitos pontuais dentro da apatita e assim, íons poderiam ser removidos das superfícies dos cristais por meio de soluções aquosas no interior dos poros do esmalte.

Ainda, buscando explicações para as alterações do conteúdo mineral após irradiação do esmalte, podemos recorrer às alterações estruturais observadas no presente estudo na MEV, onde verificamos que a irradiação causou alterações no esmalte, aumento dos espaços interprismáticos, e como os espécimes foram armazenados em saliva artificial, suspeita-se que possa ter ocorrido tanto a perda quanto o ganho de íons. Como o método utilizado (EDX) só permite a análise dos elementos químicos presentes no tecido, não se sabe se os elementos apresentam um aumento da quantidade de fase química ou a formação de uma nova fase, sendo necessários mais estudos para elucidar esses processos.

Somado a isso, um estudo publicado recentemente demonstrou maior expressão da metaloproteinase de matriz 20 (MMP-20), também chamada de enamelisina, na junção amelodentinária de dentes irradiados *in vitro*. A atividade proteolítica da MMP-20 pode ser a responsável pela degradação da estrutura de proteínas não colágenas, como amelogenina e ameloblastina, localizadas na matriz orgânica do esmalte, levando à delaminação deste tecido e contribuindo para a etiologia da cárie relacionada à radiação (MCGUIRE et al., 2014b; (CARPIO-BONILLA, 2016; QUEIROZ et al., 2019; QUEIROZ et al., 2020).

Ao discutir sobre efeitos diretos da RT nas estruturas dentárias e ao analisar os resultados do presente estudo, é possível inferir que a radiação pode causar uma oxidação não seletiva de componentes orgânicos, incluindo a descarboxilação e proteólise de proteínas não colágenas do esmalte que estão presentes na região interprismática deste tecido (MITCHELL et al., 1998; HÜBNER et al., 2005; MCGUIRE et al., 2014a) e que estes efeitos são cumulativos e se tornam ainda mais severos com a reirradiação.

Há um consenso, porém, de que a cárie relacionada à radiação é um processo multifatorial, dependente dos efeitos diretos e indiretos da radiação (KIELBASSA et al., 2006) e que as proteínas interprismáticas existentes no esmalte garantem propriedades viscoelásticas a este tecido, permitindo a distribuição homogênea das cargas mastigatórias (YAHYAZADEHFAR E AROLA, 2015). Portanto, embora seja necessário mais estudos a fim de

elucidar as alterações micromorfológicas descritas neste estudo atuam como fatores preditivos para a ocorrência de lesões de cárie relacionadas à irradiação, ao nosso ver, tais mudanças são responsáveis pela formação de uma camada altamente porosa e mais permeável do esmalte, que poderia contribuir para ocorrência dos problemas dentais observados nos pacientes após o término da RT para CCP, incluindo rápido início e progressão das lesões de cárie e propagação de fraturas. Além disso, os resultados também nos permitem inferir que a toxicidade causada pela RT ao esmalte dentário é ainda maior e mais complexa em casos de reirradiação, sendo de fundamental importância ampliar o conhecimento sobre os efeitos provocados pelas doses adicionais, utilizadas em casos de retratamento.

5.3. Dentina

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

Com relação à MEV, no presente estudo foi possível observar evidentes alterações morfológicas na dentina de dentes permanentes após irradiação com 60Gy. Ao compararmos à dentina não irradiada, verificou-se uma desorganização deste tecido como um todo, caracterizada pela degradação da rede de fibras colágenas e pelo aparecimento de “fendas”, sugerindo um aumento da friabilidade deste tecido. Com a reirradiação as alterações morfológicas se tornaram ainda mais evidentes e complexas. Nos dentes reirradiados foi possível observar degradação da estrutura intertubular, peritubular e intratubular, presença de fendas em toda estrutura dentinária, obliteração dos túbulos e degradação da rede de fibras colágenas.

Grötz et al. (1997) atribuíram a obliteração dos túbulos dentinários, em dentes permanentes irradiados, à degeneração dos processos odontoblásticos sendo essa degeneração, segundo os autores, resultado do dano radiogênico direto às células, com

redução do metabolismo, particularmente na área terminal dos odontoblastos. No presente estudo, utilizamos dentes extraídos e, portanto, sem atividade odontoblástica, por este motivo associamos a desorganização do tecido dentinário à fragmentação da rede de fibras colágenas, demonstrada pela MEV. Observa-se ainda nos espécimes que receberam as maiores doses de radiação uma superfície dentinária amorfa e desorganizada.

De acordo com Mantovani (2011), a dentina é um substrato consideravelmente complexo e o desequilíbrio entre os componentes minerais e orgânicos pode comprometer suas propriedades mecânicas, tais como elasticidade e dureza. A alteração da estrutura dentinária de dentes permanentes irradiados foi observada por Soares et al. (2010), ao estudarem o efeito da radiação sobre a resistência à tração da dentina em relação à localização e orientação dos túbulos dentinários. De acordo com Chistiakov et al. (2008) a irradiação de proteínas ocasiona alterações em suas estruturas secundárias e terciárias tendo, consequentemente, efeito prejudicial sobre a hidratação das fibras colágenas pela ação de radicais livres. No presente estudo, observou-se o aparecimento de “fendas” nas estruturas dentinárias e também a fragmentação de fibras colágenas, após as doses de 60Gy. Tais alterações foram ainda mais evidentes conforme a dose de radiação foi aumentada, durante o processo de reirradiação até as doses de 30, 40 e 50Gy. Estas alterações possivelmente foram resultantes da perda de hidratação das fibras colágenas, o que tornou o tecido ressequido e friável.

Sabe-se que a radiação atua sobre a água, levando à formação de radicais livres e peróxido de hidrogênio (COLE E SILVER, 1963; FISHER et al., 1971). Sendo assim, um tecido com maior conteúdo aquoso estaria mais vulnerável aos efeitos da radiação, podendo impactar de maneira mais intensa as suas propriedades mecânicas. O tecido dentinário atua como suporte do esmalte, e estando sua estrutura comprometida, é possível que este suporte se torne menos eficiente, contribuindo para a ocorrência de fraturas e trincaduras de esmalte (REED et al., 2015).

Por meio da espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX), no presente estudo o conteúdo mineral da dentina foi quantificado e, de acordo com os resultados obtidos, pôde-se inferir que houve um discreto aumento na porcentagem de oxigênio e uma diminuição na porcentagem de fósforo e cálcio, após 60Gy de irradiação, quando comparada com o grupo controle não irradiado. Estas diferenças seguiram o mesmo padrão e se tornaram ainda mais

evidentes ao compararmos a porcentagem dos dados extraídos dos grupos dos elementos que foram reirradiados até as doses de 30, 40 e 50Gy.

Outro fator importante a ser considerado nesta análise, é o alto teor de água existente no tecido dentinário (MIJOR, 1972). A interação entre radiação e água é alta (COLE e SILVER, 1963). O processo de radiólise libera no ambiente os íons H^+ e OH^- que, uma vez livres, podem interagir com outros íons e produzir novos compostos. Este fato explica a diminuição dos íons C e os valores mais baixos do peso Ca/P após a exposição à radiação. Mais uma vez, os íons liberados pela água após a exposição à radiação induziram a formação de uma fase secundária de fosfato de cálcio não apatítica, o que provavelmente tornaria o tecido mais suscetível à degradação (CELIK et al., 1008). A formação desses radicais livres e a permanência deles nos tecidos dentais pode perdurar por longos períodos de tempo (COLE et al., 1963), fato que justificaria o risco aumentado de desenvolvimento de lesões cariosas e/ou fraturas na estrutura dentinária, mesmo após o término do procedimento de irradiação.

Estudo realizado por Velo (2018) observou também a incorporação de magnésio (Mg) após irradiação com 55 e 70Gy. O Mg como componente substituinte inibe o crescimento do cristal e influencia fortemente os parâmetros de rede, o que pode ter tornado a apatita amorfa. Essa alteração favorece a ocorrência arranjo de cristal menos bem estruturado, aumentando a permeabilidade e susceptibilidade desse substrato a rachaduras, contribuindo para obliteração dos túbulos dentinários (LINDEN et al., 1986). Esses defeitos estruturais podem tornar a dentina seca e friável (GONÇAVES et al., 2014), o que também prejudicaria sua resistência mecânica e poderia estar relacionado ao desenvolvimento e progressão mais rápida das lesões de cárie em substratos irradiados.

Com relação às alterações nos componentes orgânicos da dentina, elas poderiam ser parcialmente explicadas pela indução e ativação de enzimas que degradam o colágeno por exposição à radiação, como as metaloproteinases da matriz (SPRINGER et al., 2005). Quando o colágeno tipo IV é degradado, ocorre uma instabilidade no substrato e um aumento do risco de fratura, uma vez que o colágeno tipo IV tem um papel bioquímico e estrutural fundamental na ligação molecular do esmalte e dentina (MCGUIRE et al., 2015; SANTIN et al., 2015; CARPIO-BONILLA, 2016; ARID et al., 2019; QUEIROZ et al., 2019; MELLARA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020). Sendo assim, a irradiação pode interferir negativamente no processo de união destes tecidos, por meio da junção amelodentinária.

Com base em nossos achados, podemos afirmar que a dentina é extremamente vulnerável aos efeitos da radiação e, considerando o cenário clínico dos pacientes em tratamento radioterápico de CCP, em que a quantidade e composição da saliva é drasticamente alterada (CRADDOCK et al., 2006), estas alterações atuariam sinergicamente como fatores preditivos para ocorrência da cárie relacionada a radiação.

Na literatura específica, os estudos que avaliaram alterações do esmalte e da dentina de dentes permanentes, antes e após irradiação foram realizados *in vitro* ou *in situ* (AL-NAWAS et al., 2000; KIELBASSA et al., 2006, DE SIQUEIRA MELLARA, 2011; SOARES et al., 2011; DE SIQUEIRA MELLARA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; SANTIN et al., 2015; MARTINS et al., 2015; MARTINS et al., 2018; QUEIROZ et al., 2019; ARID et al., 2020; MELLARA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020).

A extrapolação clínica dos resultados desses tipos de estudo, que avaliaram os efeitos da radiação na microestrutura dentária, deve ser cautelosa, pois, embora tentemos reproduzir, ao máximo, as condições encontradas na cavidade bucal, realizando armazenamento das amostras em saliva, manutenção dos dentes em estufa, entre outros cuidados, não é possível mimetizar plenamente o que realmente ocorre no organismo vivo e os resultados podem não representar as condições clínicas reais, devido a dificuldade em reprodução *in vitro* e *in situ* de todas essas alterações clínicas e as respostas individuais de cada paciente aos efeitos da RT, como as alterações do fluxo salivar, da composição da microbiota bucal e da dieta (JANSMA et al., 1988; KIELBASSA et al., 1999; 2000 MORAIS-FARIA et al., 2015).

Entretanto, estudos *in vitro* permitem a padronização não apenas das amostras, mas também das condições experimentais, o que seria extremante difícil conseguir em estudos *in vivo*, tanto em função da natureza do estudo, como em função das condições clínicas e emocionais dos pacientes. Assim, ressaltamos que pesquisas conduzidas com este modelo de estudo são necessárias e importantes, uma vez que contribuem para avaliação, quantificação e entendimento dos efeitos da RT sobre os tecidos dentais, ainda mais em situações que podem ocasionar repercussões clínicas nos pacientes, que precisam ser entendidas a luz da ciência, a fim de propor tratamentos que permitam melhorias na qualidade de vida e, principalmente, ao considerarmos o fato de que estudos avaliando os efeitos sobre os tecidos dentários de um novo ciclo de tratamento radioterápico com intenção curativa ou paliativa das recidivas locorregionais de CCP inexistem na literatura.

Dessa forma, por meio dos resultados obtidos, conseguimos contribuir para avaliação, quantificação e entendimento dos efeitos diretos da RT sobre os tecidos dentais e sugerir que a toxicidade causada pela radiação ao esmalte dentário é ainda maior e mais complexa em casos de reirradiação, sendo de fundamental importância ampliar o conhecimento sobre os efeitos provocados pelas doses adicionais, utilizadas em casos de retratamento, muitas vezes acima das doses de tolerância dos tecidos irradiados.

Especula-se com estes resultados, uma vez que a RT na região de cabeça e pescoço afeta as funções orais do paciente, sob diferentes aspectos, para o resto de sua vida, influenciando negativamente a qualidade de vida dos mesmos, que já estão debilitados, tanto fisicamente, quanto psicologicamente (DIRIX et al., 2008) e que estes pacientes com CCP são reconhecidamente pacientes com condições bucais precárias, a atuação do cirurgião-dentista e o acompanhamento odontológico desses pacientes se faz necessário em todas as fases do tratamento radioterápico (antes, durante e após a sua conclusão), a fim de minimizar os efeitos secundários indesejáveis da RT e possibilitar uma melhor qualidade de vida ao paciente. Em casos de retratamento, onde as consequências são ainda mais graves, cumulativas e proporcionais as doses administradas, os cuidados devem ser ainda maiores.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e metodológicas empregadas no presente estudo, concluiu-se que a reirradiação ocasionou alterações químicas e morfológicas progressivas nas estruturas do esmalte e da dentina com o escalonamento das doses de radiação.

- Pela análise dos espectros, pode-se inferir que as alterações geradas pela RT sobre a composição dos dentes são diretamente proporcionais à dose administrada e, portanto, mais severas após a reirradiação.

  - O Raman, para os diferentes grupos, nas diferentes regiões, indica alteração das áreas e dos picos de interesse, demonstrando que as alterações na estrutura e na composição química do esmalte são progressivas e proporcionais ao aumento das doses de radiação.

  - Por meio do EDX pode-se observar que, após a reirradiação dos espécimes, houve um aumento na porcentagem de oxigênio e diminuição nas porcentagens de fósforo e cálcio tanto no esmalte, como na dentina.

- Pela análise morfológica, por meio da MEV, pode-se inferir que, em:

  - *Esmalte*: Não foi possível identificação da região interprismática nem dos prismas e dos cristais de esmalte, devido a degradação desse tecido, fato este que ficou mais evidente com escalonamento das doses de radiação;

  - *Dentina:* Após a reirradiação, observou-se colapso de toda estrutura dentinária, onde não foi mais possível observar os túbulos dentinários e as fibras colágenas.

REFERÊNCIAS

1. Adelstein DJ. Systemic chemotherapy for squamous cell head and neck cancer. Expert Opin Pharmacother. 2003; 4(12):2151-63.
2. Al-Nawas B, Grotz KA, Rose E, Duschner H, Kann P, Wagner W. Using ultrasound transmission velocity to analyse the mechanical properties of teeth after in vitro, in situ, and in vivo irradiation. Clin Oral Investig. 2000; 4(3):168-72.
3. Allal AS, Taussky D, Mach N, Becker M, Bieri S, Dulguerov P. Can concomitant-boost accelarated radiotherapy be adopted as routine treatment for head-and-neck cancers? A 10-year single-institution experience. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;58(5):1431-6.
4. Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralization of eroded enamel lesions by saliva. J Dent. 2001;29(5):371-6.
5. Amar A, Franzi AS, Rapoport A. Evolution of patients with squamous Cell carcinoma of upper aerodigestive tract. São Paulo Med J. 2003; 121(4):155-158.
6. American Cancer Society. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: American Cancer Society, 2019a.
7. Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 1. Aust Dent J. 2001; 46(2): 88-94.
8. Anneroth G, Holm LE, Karlsson G. The effect of radiation on teeth. A clinical, histologic and microradiographic study. Int J Oral Surg. 1985; 14(3):269-74.
9. Antoni S, Soerjomatarama I, Mollerb B, Bray F, Ferlay J. An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. Bulletin of the World Health Organization. 2016; 94:174-184.
10. Arid J, Palma-Dibb RG, de Oliveira HF, Nelson-Filho P, de Carvalho FK, da Silva LAB, de Siqueira Mellara T, da Silva RAB, Faraoni JJ, de Queiroz AM. Radiotherapy impairs adhesive bonding in permanent teeth. Support Care Cancer. 2020; 28(1):239-247.
11. Baker DG. The radiobiological basis for tissue reactions in the oral cavity following therapeutic x-irradiation. A review. Arch Otolaryngol. 1982; 108(1):21-4.
12. Baker F, Ainsworth SR, Dye JT, Crammer C, Thun MJ, Hoffmann D, et al. Health risks associated with cigar smoking. JAMA, Chicago. 2000; 284 (6):735-740.
13. Ballesteros OFM, Heros FA. Epidemiologia del cáncer de laringe en la provincia de Guadalajara. ORL-DIPS. 2002; 29 (4):172-179.

14. Banco de Dados GLOBOCAN 2018. IARC: Global Cancer Observatory (GCO). Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC).
15. Beech N, Robinson S, Porceddu S, Batstone M. Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. Dent J. 2014; 59(1):20-8.
16. Bensadoun RJ, Riesenbeck D, Lockhart PB, Elting LS, Spijkervet FKL, Brennan MT, et al. A systematic review of trismus induced by cancer therapies in head and neck cancer patients. Support Care Cancer. 2010; 18:1033-38.
17. Bergamasco V, Marta GN, Kowalski LP, Carvalho AL. Epidemiological profile of the head and neck cancer in the State of São Paulo. Rev Bras Cir Cabeça Pescoço. 2008; 37(1):15-9.
18. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Anatomia, embriologia e histologia bucal. 3ed. Artmed Editora. 2004.
19. Bessell A, Glenny AM, Furness S, Clarkson JE, Oliver R, Conway DI, Macluskey M, Pavitt S, Sloan P, Worthington HV. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. Cochrane Database of Syst Rev. 2011; 7(9).
20. Boehm A, Wichmann G, Mozet C, Dietz A. Current therapy options in recurrent head and neck cancer. HNO. 2010; 58(8):762-9.
21. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, Hoboken. 2018; 68(6):394-424.
22. Brody S. The dentist's role within the multi-disciplinary team maintaining quality of life for oral cancer patients in light of recent advances in radiotherapy. J. Dent. Res. 2013; 59(3):137-46.
23. Bulatov IV, Feller YY, Schechter I. Dental enamel caries (early) diagnosis and mapping by laser raman spectral imaging instrum. Sci. Technol. 2008; 36(3):235–44.
24. Bulucu B, Avsar A, Demiryurek EO, Yesilyurt C. Effect of radiotherapy on the microleakage of adhesive systems. J Adhes Dent. 2009; 11(4):305-9.
25. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer. 2011; 11(2):85-95.
26. Carpio-Bonilla CM. Radioterapia ativa e inibidores de proteases inativam MMPs, na junção amelodentinária de dentes permanentes. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

27. Carvalho AL, Ikeda MK, Magrin J, Kowalski LP. Trends of oral and oropharyngeal cancer survival over five decades in 3267 patients treated in a single institution. Oral Oncol. 2004; 40(1):71- 6.
28. Celik EU, Ergücü Z, Türkün LS, Türkün M. Effect of different laser devices on the composition and microhardness of dentin. Oper Dent. 2008; 33(5):491–496.
29. Chaschouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G, Rodemann HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. Radiother Oncol. 2011; 99(3):287-92.
30. Cheung DT, Perelman N, Tong D, Nimni ME. The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. J Biomed Mater Res. 1990; 24(5):581–9.
31. Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. Acta Oncol. 2008; 47(5):809-24.
32. Coello MB, López-Álvarez M, Rodríguez-Domínguez JS, González P. Quantitative evaluation of the mineralization level of dental tissues by raman spectroscopy. Biomed. Phys. Eng. Express. 2015; 1(4):45204.
33. Cole T, Silver AS. Production of hydrogen atoms in teeth by X-irradiation. Nature. 1963; 16(200):700-1.
34. Craddock HL. Treatment and maintenance of a dentate patient with 'radiation caries'. Dent Update. 2006; 33(8):462–68.
35. De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. Microsc Res Tech. 2010; 73(5): 572-577.
36. De Oliveira Mota CC, Gueiros LA, Maia AM, Santos-Silva AR, Gomes AS, Alves FA, Leão JC, de 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.
37. De Siqueira Mellara T, Palma-Dibb RG, de Oliveira HF, Garcia Paula-Silva FW, Nelson-Filho P, da Silva RA, da Silva LA, de Queiroz AM. The effect of radiation therapy on the mechanical and morphological properties of the enamel and dentin of deciduous teeth – an *in vitro* study. Radiation Oncology. 2014; 22(9):30.

38. Devita JR VT, Lawrence TS, Rosenber S. Cancer: Principles and practice of Oncology. Pennsylvania: Lippincott Williams &Wilkins. 2011.
39. Dholam KP, Somani PP, Prabhu SD, Ambre SR. Effectiveness of fluoride varnish application as cariostatic and desensitizing agent in irradiated head and neck cancer patients. Int J Dent. 2013; 1-5.
40. Dirix P, Nuyts S, Vander Poorten V, Delaere P, Van Den Bogaert W. The influence of xerostomia after radiotherapy on quality of life: results of a questionnaire in head and neck cancer. Support Care Cancer, v. 16, n. 2, p. 171-179, 2008.
41. Driessens FCM, Verbeek RMH. Biominerals. Boca Raton, CRC Press, 1989.
42. Dugal MS, Chawla HS, Curzon, MEJ. A study of the relationship between trace elements in saliva and dental caries in children. Artchs oral biol. 1991; 36(12):881-4.
43. Eckardt A, Barth EL, Kokemueller H, Wegener G. Recurrent carcinoma of the head and neck: treatment strategies and survival analysis in a 20-year period. Oral Oncol. 2004; 40(4):427-32.
44. Epstein JB, Stevenson-Moore, P. Periodontal disease and periodontal management in patients with cancer. Oral Oncol. 2001; 37:613-19.
45. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. Tumour Biol. 2010; 31(4):363-72.
46. Espíndula JA. Vivências de mães em situação de recidiva de câncer em seus filhos. [Dissertação de Mestrado – Não-publicada]. Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – pg. 108, 2001.
47. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 2002; 18(10):872-9.
48. Fanucchi M, Khuri FD, Shin D, Johnstone PAS, Chen A. Update in the management of head and neck cancer. Update on Cancer Therapeutics. 2006; 1(2):211-19.
49. Felszeghy S. Type x collagen in human enamel development: a possible role in mineralization. Acta Odontol Scand, 2000; 58.
50. Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. 1ed. Editora Santos. 2005.
51. Ferguson DMD, Stevens MR. Advances in Head and Neck Radiotherapy to the Mandible. Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America. 2007; 19:553-63.

52. Ferlay J. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010; 127(12):2893-2917.

53. Ferreira Antunes JL, Toporcov TN, Biazevic MG, Boing AF, Scully C, Petti S. Joint and independent effects of alcohol drinking and tobacco smoking on oral cancer: a large case-control study. PLoS One. 2013; 8(7):68132.

54. Fisher BV, Morgan RE, Phillips GO, Wardale HW. Radiation damage in calcium phosphates and collagen: an interpretation of ESR spectra. Radiat Res. 1971; 46(2):229-35.

55. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015. JAMA Oncol. 2017; 3:524-48.

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

57. Galbiatti ALS, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CDS, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. Braz. J. Otorhinolaryngol. 2013; 79(2):239-47.

58. Gale MS, Darvel BW. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. J Dent. 1999; 27: 89-99.

59. Galetti R, Santos-Silva AR, Antunes NGA, Alves AF, Lopes MA, de Goes MF. Radiotherapy does not impair dentin adhesive properties in head and neck cancer patients. Clinic O Invest. 2014; 18(7):1771-78.

60. Gaudet MM. Anthropometry and head and neck cancer: a pooled analysis of cohort data. Int J Epidemiol. 2015; 44(2):673-83.

61. Gasga JR. Estudio del esmalte dental humano por microscopia electrónica y técnicas afines. Rev. Latinam. 2001; 21(2):81-5.

62. Germano F, Melone P, Testi D, Arcuri L, Marmiroli L, Petrone A, et al. Oral complications of head and neck radiotherapy: prevalence and management. Minerva Stomatol. 2015; 64(4):189-202.

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

64. Gilchrist F, Santini A, Harley K, Deery C. The use of micro-raman spectroscopy to differentiate between sound and eroded primary enamel. Int J Ped Dent. 2007; 17:274-80.
65. Gillison ML. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. Vaccine. 2012; 30:34-54.
66. Glenny AM, Furness S, Worthington HV, Conway DI, Oliver R, Clarkson JE, *et al*. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: radiotherapy. Cochrane Database of Syst Rev. 2010; 8(12).
67. GLOBOCAN 2018, Banco de dados acessível online como parte do IARC Global Cancer Observatory (GCO). Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC).
68. Gonçalves LMN. Efeito da Radioterapia sobre as propriedades mecânicas, químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes – Estudo In vitro. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.
69. Gonçalves LMN, Palma-Dibb RG, Paula-Silva FW, Oliveira HF, Nelson-Filho P, Silva LA, Queiroz AM. Radiation therapy alters micro hardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. Journal Dent. 2014; 42(8):986-92.
70. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. Histotomography studies of direct radiogenic dental enamel changes. Mund Kiefer Gesichtschir. 1998;2(2):85–90.
71. Gwinnett AJ. Structure and composition of enamel. Oper Dent. 1992; 5(5):10–7.
72. Haas I, Hauser U, Ganzer U. The dilemma of follow-up in head and neck cancer patients. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2001; 258(4):177-183.
73. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144(5): 646-674.
74. Hannig M, Dounis E, Henning T, Apitz N, Stösser L. Does irradiation affect the protein composition of saliva? Clin Oral Investig. 2006;10(1):61-5.
75. Harrington K, Nutting C, Newbold K, Bhide S. Principles and practice of head and neck surgery and oncology. Chapman and Hall – CRC. 2009.
76. Hashibe M. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. J NatL Cancer Inst. 2007; 99(10):777-789.

77. Hashibe M. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidem Biomar. 2009; 18(2):541-50.

78. Herrassi MY, Bentayeb F, Malisan MR. Comparative study of four advanced 3dconformal radiation therapy treatment planning techniques for head and neck cancer. J Med Phys. 2013; 38(2):98-105.

79. Hinds PS, Birenbaum LK, Clarke-Steffen L, Quargnenti A, Kreissman S, Kazak A, Meyer W, Mulhern R, Pratt C, Wilimas J. Coming to terms: Parents' response to a first cancer recurrence in their child. Nursing Research. 1996; 45(3):148-53.

80. Hong CHL, Napeñas JJ, Hodgson BD, Stokman MA, Mathers-Stauffer M, Elting LS, *et al.* A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. Support Care Cancer. 2010; 18:1007-21.

81. Hong A, Dobbins T, Lee CS, Jones D, Jackson E, Clark J, Armstrong B, *et al.* Relationships between epidermal growth factor receptor expression and human papillomavirus status as markers of prognosis in oropharyngeal cancer. Eur J Cancer. 2010; 46.

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

83. Hübner W, Blume A, Pushnjakova R, Dekhtyar Y, Hein HJ. The influence of X-ray radiation on the mineral/organic matrix interaction of bone tissue: an FT-IR microscopic investigation. Int J Artif Organs. 2005; 28(1):66-73.

84. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Ministério Da Saúde. Carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço. Rev. Bras. Cancerol. 2001 ;47(4):361-76.

85. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: https://www.inca.gov.br/incidencia-de-cancer. Acesso em: 5 mar. 2020.

86. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Tipos de câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer. Acesso em: 5 set. 2019.

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

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

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

90. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. Can J Clinic. 2011; 61(2):69-90.

91. Jensen SB, Pedersen AML, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, *et al.* A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. Support Care Cancer. 2010; 18:1039-60.

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

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

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

95. Karatzanis AD, Psychogios G, Zenk J, Waldfahrer F, Hornung J, Velegrakis GA, *et al.* Evaluation of available surgical management options for early supraglottic cancer. Head Neck. 2010; 32(8):1048-55.

96. Khaw A, Logan R, Keefe D, Bartold M. Radiation-induced oral mucosites and periodontitis – proposal for inter-relationship. Oral Diseases. 2014; 20(3):7-18.

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

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

99. Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. Radiation-related damage to dentition. Lancet Oncol. 2006; 7(4): 326-35.

100. Kim ES, Hong WK, Khuri FR. Chemoprevention of aerodigestive tract cancers. Annual Reviews Medicine. 2002; 53:223-243.

101. Ko ACT. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and raman spectroscopy. J Biomed. Opt. 2005; 10: 31118.

102. Ko ACT, Choo-Smith I, Hewko M, Sowa MG, Dong CCS and Cleghorn B. Detection of early dental caries using polarized raman spectroscopy. 2006; 14(1):203–15.
103. Ko ACT, Hewko M, Sowa MG, Dong CCS and Cleghorn B, Choo-Smith I. Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization resolved raman spectroscopic system, Opt. Express. 2008; 16(9):6274–84.
104. Li J, Choo-Smith LP, Tang Z, Sowa MG. Background removal from polarized Raman spectra of tooth enamel using the wavelet transform. Journal of Raman Spectroscopy. 2010; 42(4):580-85.
105. Liang X, Zhang J, Peng G, Li J, Bai S. Radiation caries in nasopharyngeal carcinoma patients after intensity-modulated radiation therapy: A cross-sectional study. J Dent Sci. 2016; 11:1-7.
106. Lieshout HF, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue - a systematic review. Clin Oral Invest. 2014; 18:17-24.
107. Lindén LA, Björkman S, Hattab F. The diffusion in vitro of fluoride and chlorhexidine in the enamel of human deciduous and permanent teeth. Arch Oral Biol. 1986; 31(1):33-37.
108. Locca O, Farcomeni A, Di Rocco A, Di Maio P, Golusinski P, Pardiñas López S, *et al.* Locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and Bayesian network meta-analysis of the currently available treatment options. Oral Oncol. 2018; 80:40-51.
109. Mantovani CPT. Análise das propriedades físicas e químicas da dentina de dentes decíduos e permanentes. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.
110. Marangoni-Lopes L, Rovai-Pavan G, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M. Radiotherapy Reduces Microhardness and mineral and organic composition and Changes the Morphology of Primary Teeth: an *in vitro* study. Caries Res. 2019; 53(3):296-304.
111. Markitziu A, Gedalia I, Rajstein J, Grajover R, Yarshanski O, Weshler Z. In vitro irradiation effects on hardness and solubility of human enamel and dentin pretreated with fluoride. Clin Prev Dent. 1985; 8(4)4-7.

112. Marta GN, Silva V, de Andrade Carvalho H, de Arruda FF, Hanna SA, Gadia R *et al*. Intensitymodulated radiation therapy for head and neck cancer: systematic review and metaanalysis. Radiother Oncol. 2014; 110(1):9-15.
113. Martins CV, Leoni GB, Oliveira HF, Arid J, Queiroz AM, Silva LAB, Sousa-Neto MD. Influence of therapeutic cancer radiation on the bond strength of an epoxy- or an MTA-based sealer to root dentine. Int Endod J. 2018; 49(11):1065-1072.
114. Mathers CD, Bernard C, Iburg KM, Inoue M, Fat DM, Shibuya K, Stein C, Tomijima N, Xu H. Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results. Geneve: World Health Organization, 2003; 54.
115. Mavropoulos E. A hidroxiapatita como absorvedor de metais. [Dissertação de Mestrado]. Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.
116. Mazeron JJ, Ardiet JM, Haie-Meder C, Kovacs G, Levendag P, Peiffert D, *et al*. GEC-ESTRO recommendations for brachytherapy for head and neck squamous cell carcinomas. Radiother Oncol. 2009; 91(2):150-6.
117. Mc Caul LK. Oral and Dental Management for Head and Neck Cancer Patients Treated by Chemotherapy and Radiotherapy. Dental Update. 2012; 39:135-40.
118. McGuire JD, Mousa AA, Zhang BJ, Todoki LS, Huffman NT, Chandrababu KB, Moradian Oldak J, Keightley A, Wang Y, Walker MP, Gorski JP. Extracts of irradiated mature human tooth crowns contain MMP-20 protein and activity. J Dent. 2014; 42(5):626-35.
119. Mellara TS, Paula-Silva FWG, Arid J, de Oliveira HF, Nelson-Filho P, Bezerra Silva RA, Torres FM, Faraoni JJ, Palma-Dibb RG, de Queiroz AM. Radiotherapy Impairs Adhesive Bonding in Primary Teeth: An In Vitro Study. J Dent Child (Chic). 2020; 87(2):69-76.
120. Mitchell MJ, Logan PM. Radiation-induced changes in bone. Radiographics 1998; 18(5):1125-113.
121. Mjör IA. Human coronal dentin: structure and reactions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1972; 33(5):810–813.
122. Moore C, McLister C, Cardwell C, O'Neill C, Donnelly M, McKenna G. Dental caries following radiotherapy for head and neck cancer: A systematic review. Oral Oncol. 2020.
123. Morais-Faria K, Menegussi G, Marta G, Fernandes PM, Dias RB, Ribeiro AC, Lopes MA, Cernea CR, Brandão TB, Santos-Silva AR. Dosimetric distribution to the teeth of

patients with head and neck cancer who underwent radiotherapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2015; 120(3):416-9.

124. Müller S, Pan Y, Li R, Chi AC. Changing trends in oral squamous cell carcinoma with particular reference to young patients: 1971–2006. The Emory University experience. Head Neck Pathol. 2008; 2:60-66.
125. Nabil S, Samman N. Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg. 2011; 40:229-243.
126. Naidu MUR, Ramana GV, Rani PU, Mohan Iyyapu K, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy induced oral mucositis-complicating the treatment of cancer. Neoplasia. 2004; 6:423-31.
127. National Cancer Registration and Analysis Service. Chemotherapy, Radiotherapy and Surgical Tumour Resections in England: 2013-2015. Diagnoses 2018. Acessado em: 22/02/2019.
128. Nelson DGA. The influence of carbonateon the atomic structure and reativity of hydroxiapatite. J Dent Res. 1981; 60:1621-9.
129. Ng JH, Iyer NG, Tan MG, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: a global study. Head Neck. 2017; 39:297-304.
130. Nieder C, Andratschke NH, Grosu AL. Increasing frequency of reirradiation studies in radiation oncology: systematic review of highly cited articles. Am J Cancer Res. 2013; 3(2):152-8.
131. Novaes PERS, Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyasu H, Kowalski LP, editors. Bases da oncologia. 1 ed. São Paulo: ED. Marina; 1998.
132. Ohrn KE, Wahlin YB, Sjoden PO. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. Support Care Cancer. 2001; 9:247-57.
133. Organização Mundial da Saúde (OMS) – Ficha de informação – 2017 – http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/ – Acesso em: 30/01/2018.
134. Otmani N. Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children. J Can Dent Assoc. 2007; 73(3):257-61.
135. Paleri, N. Introduction to the United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines for Head and Neck Cancer. J Laryngol Otol. 2016; 130:S3-S4.

136. Pelisser FVV, Rockenbach MIB, de Figueiredo MAZ, Cherubini K, Veeck EB. Considerations of the radiotherapy modalities used in the management of head and neck neoplasms RFO. 2008; 13(1):75-79.
137. Pintos J. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canadá. Oral Oncology. 2008; 44(3):242-50.
138. Pioch T, Golfels D, Staehle HJ. An experimental study of the stability of irradiated teeth in the region of the dentinoenamel junction. Endod Dent Traumatol. 1992; 8(6):241-4.
139. Pistoia AD, Pistoia GD, Neto MM, Hahn D, Rigodanzo L. Manifestações bucais decorrentes do tratamento antineoplásico. Revista de Dentística. 2004; 3(9).
140. Queiroz AM, Bonilla CMC, Palma-Dibb RG, Oliveira HF, Nelson-Filho P, Silva LAB, Lucisano MP, Paula-Silva FWG. Radiotherapy Activates and Protease Inhibitors Inactivate Matrix Metalloproteinases in the Dentinoenamel Junction of Permanent Teeth. Caries Res. 2019; 53(3):253-259.
141. Queiroz AM, Carpio-Bonilla CM, Arnez MFM, Dos Santos TT, Palma-Dibb RG, Oliveira HF, Nelson-Filho P, Silva LAB, Paula-Silva FWG. Radiotherapy Activates Matrix Metalloproteinases in the Dentinoenamel Junction of Primary Teeth. J Dent Child (Chic). 2020 May 15;87(2):83-89.
142. Quing P. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth enamel. Scientific Reports. 2015; 5:11568.
143. Rampling T, King H, Mais KL, Humphris GM, Swindell R, Sykes A. Quality of life measurement in the head and neck cancer radiotherapy clinic is it feasible and worthwhile? Clin Oncol. 2003; 15(4):205-10.
144. Ränzel W, Gerlach R. The irradiation action on human dental tissue by X-rays and electrons – a nanoindenter study. Z Med Phys. 2009; 19(1):5–10.
145. 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. Archives of Oral Biology. 2015; 60(5):690–697.
146. Regezi JA, Sciubba JJ. Condições ulcerativas. Patologia bucal. Correlações clinicopatológicas. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; 27-75.
147. Reitznerová E, Amarasiriwaardena D, Kopcaková M, Barnes RM. Determination of some trace elements in human tooth enamel. J Anal Chem. 2000; 367:748-54.

148. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. Surgical Oncology Clinics. 2015; 24(3):379-96.
149. Ribeiro MF, Sathaiah S, Pacheco MT. Diagnóstico não-invasivo de tecidos dentários através da utilização da espectroscopia raman. Latinoameric Eng Bio. 2001.; 5.
150. Rodrigues ADG and Galzerani JC. Espectroscopias de infravermelho, raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. Rev. Bras. Ensino da física. 2012; 34 (4).
151. Rosales CMN, Esteves SCB, Almeida JOPA, Lopes MA. Dental Needs in Brazilian Patients Subjected to Head and Neck Radiotherapy. Braz Dent J. 2009; 20(1):74-77.
152. Rose-Ped AM, Bellm LA, Epstein JB, Trotti A, Gwede C, Fuchs HJ. Complications of radiation therapy for head and neck cancers. The patient's perspective. Cancer Nurs. 2002; 25(6):461-7.
153. Sala O. Fundamentos da espectroscopia raman e no infravermelho. 2ed, Editora Unesp – São Paulo. 2008.
154. Saleh J, Willke LW, Bassani IA, Kraether L, Molz RF, Santos LA. Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Porto Alegre, 2004.
155. Santin GC, Palma-Dibb RG, Romano FL, Oliveira HF, Nelson-Filho P, de Queiroz AM. Physical and adhesive properties of dental enamel after radiotherapy and bonding of metal and ceramic brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2015; 148(2):283-92.
156. Schulze KA, Balooch G, Marshall SJM. Micro-raman spectroscopic investigation of dental calcified tissues. J Biomed Mater Res. 2004; 69:286-93.
157. Schwartz GJ, Mehta RH, Wenig BL, Shaligram C, Portugal LG. Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. Head Neck. 2000; 22(1): 34-41.
158. Setally Azevedo Macena M, de Alencar e Silva Leite ML, de Lima Gouveia C, de Lima TA, Athayde PA, de Sousa FB. A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts. Arch Oral Biol. 2014; 59(6):568-577.
159. Shapiro JA, Jacobs EJ, Thun MJ. Cigar smoking in men and risk of death from tobacco-related cancers. Journal of the National Cancer Institute, Bethesda. 2000; 92(4):333-337.

160. Siala W, Mnejja W, Elloumi F, Ghorbel A, Mnif J, Frikha M *et al.* Late Toxicities after Conventional Radiotherapy for Nasopharyngeal Carcinoma: Incidence and Risk Factors. J Radiother. 2014; 1-8.
161. Silva AR, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. Caries Res. 2009; 43(1):43-9.
162. koog DA, Holler FJ, Nieman TA. Princípios de análise instrumental. 5ed. Bookman, 2002.
163. Slosarczyk A, Piekarczyk J. Ceramic materials on the basis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate. Ceram Int. 1999; 25(6):561–565.
164. Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PC, Naves LZ, Pereira PN. Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. J Dent Res. 2010;89(2):159-64.
165. Soares CJ, Neiva NA, Soares PB, Dechichi P, Novais VR, Naves LZ, Marques MR. Effects of chlorhexidine and fluoride on irradiated enamel and dentin. J Dent Res. 2011; 90(5):659-64.
166. Sowa MG. Precision of raman depolarization and optical attenuation measurements of sound tooth enamel. Anal. Bioanal. Chem. 2007; 387(5):1613-9.
167. Specht L. Oral complications in the head and neck radiation patient. Introduction and scope of the problem. Support Care Cancer. 2002; 10(1):36-9.
168. Springer IN, Niehoff P, Warnke PH, Böcek G, Kovács G, Suhr M, Wiltfang J, Açil Y. Radiation caries--radiogenic destruction of dental collagen. Oral Oncol. 2005 Aug;41(7):723-8.
169. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5Rs of radiobiology. Int J Radiat Biol. 1989; 56:1045-48.
170. Stoker SD, Van Diessen JN, de Boer JP, Karakullukcu B, Leemans CR, Tan IB. Current treatment options for local residual nasopharyngeal carcinoma. Curr Treat Options Oncol. 2013; 14(4):475-91.
171. Ten-Cate – Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
172. Ten Cate AR. Oral histology: Developmente structure and function. 5ed. St louis. Mosby, 2001.

173. Timchenko EV, Timchenko PE, Volova LT, Rosenbaum AY, Kulabukhova AY. Analysis of tooth tissues using Raman spectroscopy. Journal of Physics: Conference Series. 2016; 769, 012047.
174. Toletino E, Centurion B, Ferreira L, de Souza A, Damante JH, Rubiea-Bullen IR. Oral adverse effects of head and neck radiotherapy: literature review and suggestion of a clinical oral care guideline for irradiated patients. J Appl Oral Sci. 2011; 19(5): 448-54.
175. Torres SEM. Caracterização comparativa do esmalte de dentes decíduos e permanentes por espectroscopia Raman. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília. 2008.
176. Tota JE. Epidemiology and burden of HPV infection a related disease: implications for prevention strategies. Preventive Medicine. 2011; 53:512-21.
177. Troconis CCM. Structural Analysis Of Enamel In Teeth From Head And Neck Cancer Patients Who Underwent Radiotherapy [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, 2016.
178. Urabe I, Nakajima S, Sano H, Tagami J. Physical properties of the dentin-enamel junction region. Am J Dent. 2000; 13(3):129-35.
179. Velo MMAC, Farha ALH, da Silva Santos PS, Shiota A, Sansavino SZ, Souza AT, Honório HM, Wang L. Radiotherapy alters the composition, structural and mechanical properties of root dentin in vitro. Clin Oral Investig. 2018; 22(8):2871-2878.
180. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. Crit Rev Oral Biol Med. 2003; 14(3):199-212.
181. Vivar CG, Canga N, Canga AD, Arantzamendi M. The psychosocial impact of recurrence on cancer survivors and family members: A narrative review. Journal of Advanced Nursing. 2009; 65(4):724-736.
182. Vuotila T, Ylikontiola L, Sorsa T, Luoto H, Hanemaaijer R, Salo T, Tjäderhane L. The relationship between MMPs and pH in whole saliva of radiated head and neck cancer patients. J Oral Pathol Med. 2002; 31(6):329-38.
183. Walker MP, Williams KB, Wichman B. Post-radiation dental index: development and reliability. Support Care Cancer. 2008; 16:525-530.
184. Walker MP, Wichman B, Cheng AL, Coster J, Williams KB. Impact of Radiotherapy Dose on Dentition Breakdown in Head and Neck Cancer Patients. Practical Radiation Oncology, v.1, p. 142-148, 2011.

185. Yahyazadehfar M, Arola D. The role of organic proteins on the crack growth resistance of human enamel. Acta Biomater. 2015; 19:33-45.
186. Yuanyuan l, Hsu CS. Laser-induced compositional changes on enamel: a ftraman study. J Dentist. 2007; 35:226-30.
187. Zach GA. X-ray diffraction and calcium-phosphorous analysis of irradiated human teeth. J Dent Res. 1976; 55(5):907-9.
188. Zackrisson B, Mercke C, Strander J, Wennerberg E., Cavallin-Ståhl. A systematic overview of radiation therapy effects in head and neck cancer. Acta Oncol. 2003; 42:443-461.

ANEXO A

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da reirradiação nas propriedades mecânicas, químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes.

Pesquisador: Thais Tedeschi dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 04415318.5.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.091.548

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores informaram que a radioterapia constitui-se uma modalidade amplamente utilizada para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço (CCP). No entanto,
embora este tipo de terapia seja altamente eficaz, não é raro observar a recidiva destas doenças, recente ou tardia à cura do primeiro tumor. Este
fato não é desejável no tratamento oncológico, contudo, dependo da resposta ao tratamento, novas aplicações de radiação ionizante são
necessárias para o controle da doença. O objetivo do presente estudo será avaliar, in vitro, simulando um retratamento radioterápico para CCP, os efeitos da reirradiação nas propriedades do esmalte e da dentina de dentes permanentes, devido à ausência de estudos nesta área de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo será avaliar, in vitro, simulando um retratamento de RT para CCP, os efeitos da reirradiação nas propriedades físicas, químicas e morfológicas do esmalte e da dentina de dentes permanentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estudo in vitro.

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 3.091.548

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP. Pesquisa relevante para a área da odontologia, apresenta referências bibliográficas atualizadas e os pesquisadores são plenamente habilitados para o desenvolvimento do projeto em tela.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados. TCLE, declaração de infraestrutura, cronograma detalhado e projeto em word.

Recomendações:

Projeto aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado conforme deliberado na 222ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 17/12/2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1237763.pdf	05/12/2018 20:47:10		Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTONOVA.pdf	05/12/2018 20:46:25	Thais Tedeschi dos Santos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIOBANCO2.pdf	05/12/2018 20:46:15	Thais Tedeschi dos Santos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIOBANCO1.pdf	05/12/2018 20:45:55	Thais Tedeschi dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadoREIRRADIACAO.pdf	03/12/2018 11:07:41	Thais Tedeschi dos Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrutura.pdf	03/12/2018 11:07:30	Thais Tedeschi dos Santos	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 18 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Municipio:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br