

**EFEITO DE DOSES TERAPÊUTICAS DE RADIOTERAPIA SOBRE A  
MORFOLOGIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICRODUREZA DO  
ESMALTE E DA DENTINA DE DENTES PERMANENTES**

**MARIA MERCÊS AQUINO GOUVEIA FARIAS**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção  
do título de doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Oncologia.**

**Orientador: Dr. Fábio de Abreu Alves**

**Coorientador: Dr. Rogério Gondak**

**São Paulo**

**2023**

**Farias, Maria Mercês Aquino Gouveia.**

**Efeito de doses terapêuticas de radioterapia sobre a morfologia, composição química e microdureza do esmalte e da dentina de dentes permanentes.. / Maria Mercês Aquino Gouveia Farias. São Paulo, 2023.**

**75f.**

**Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.**

**Orientador: Fábio de Abreu Alves.**

**1. Radioterapia, 2. Esmalte Dentário, 3. Dentina**

**CDU 616**

Maria Mercês Aquino Gouveia Farias

**EFEITO DE DOSES TERAPÊUTICAS DE RADIOTERAPIA SOBRE A MORFOLOGIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICRODUREZA DO ESMALTE E DA DENTINA DE DENTES PERMANENTES.**

**Aprovado em: \_\_\_26\_\_\_/\_\_\_01\_\_\_/\_\_\_2023\_\_\_**

**Banca Examinadora**

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dra. Alyne Simões Gonçalves

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)

Membro da banca: Dra. Betsy Kilian Martins Luiz

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí- UNIVALI

Membro da banca: Dra. Graziella Chagas Jaguar

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dra. Maria Stella Nunes Araujo Moreira

Instituição: Universidade Ibirapuera

*Luz do sol*

*Que a folha traga e traduz*

*Em verde novo*

*Em folha, em graça, em vida, em força, em luz.*

*Caetano Veloso.*

*Dedico este trabalho ao meu amado marido,  
José, pela preciosidade de partilharmos a vida e aos  
nossos filhos, João Antônio e Valentine, expressão do  
amor em tom maior.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** e a **Nossa Senhora** que em meio as dificuldades que pareciam intransponíveis, colocaram em meu caminho pessoas essenciais para a realização deste trabalho.

A Universidade do Vale do Itajaí-UNIVALI, por ter viabilizado esta parceria como o A. C. Camargo Cancer Center, instituição reconhecida por sua excelência, oportunizando aos seus professores a realização deste curso.

Ao meu orientador **Professor Dr. Fábio de Abreu Alves**, pela excelência profissional, apoio e confiança na realização deste trabalho.

Ao meu coorientador **Professor Dr. Rogério Gondak**, profissional exemplar, por seu apoio generoso possibilitando caminhos para a realização deste trabalho.

Ao **Centro de Pesquisas Oncológicas- CEPON**, na pessoa da cirurgiã-dentista **Mariana Comparotto Minamisako**, do médico radiologista **Dr. Paulo Marcelo Rodrigues** e físico médico **Vicente Ribeiro Netto**.

Ao querido **Professor Dr. David Rivero Tames** pela amizade e alegria de partilhar seu vasto conhecimento.

Ao Professor da Universidade Federal de Santa Catarina **Dr. Luis Fernando Belchior Ribeiro** pela parceria, trocas e ensinamentos tão essenciais para a realização deste trabalho.

A Professora do curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina **Dra. Cleonice da Silveira Teixeira**, pela disponibilidade de partilhar seu conhecimento.

A doutoranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, **Natália Cristina Trentin Bordignon** pelas conversas e inestimável ajuda no preparo das amostras.

Ao professor da Universidade do Vale do Itajaí- UNIVALI, **Dr. Alexandre Bella Cruz** pela intermediação entre as instituições UNIVALI e A. C. Camargo Cancer Center.

A **Mariana Bitu** pela gentileza de me auxiliar na inserção do meu projeto no AC Project.

A **Domingos Lusitâneo Píer Macuvele** pelas conversas esclarecedoras.

Ao **Laboratório de Patologia Bucal** do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, na pessoa do **Professor Dr. Rogério Gondak**.

Ao **Laboratório de Engenharia Biomecânica- LEBm**, na pessoa do **Professor Dr. Carlos Roesler** e da Professora **Dra. Patrícia Ortega** e dos bolsistas **Enrico** e **Matheus**.

Ao **Laboratório Central de Microscopia Eletrônica-LCME** na pessoa da **Dra. Deise Rebelo Consoni** e **Eliana de Medeiros Oliveira**, profissionais incríveis.

A **Serginho** e **Érika**, funcionários da UNIVALI, sempre dispostos a nos ajudar.

Aos meus pais, **Antônio Veloso Gouveia (*In memorian*)** e **Maria José de Aquino Gouveia**, por terem investido com amor e coragem no poder transformador do afeto e da educação.

As minhas amadas irmãs, **Maria da Luz**, **Maria José**, **Maria Lígia** e **Maria Lucrecia**, pelo amor fraternal, parcerias e aprendizados na jornada da vida.

As minhas queridas **Beatriz**, **Eliane** e **Silvana**, parceiras de vida.

## RESUMO

Farias, Maria mercês Aquino Gouveia Farias. **Efeito de doses terapêuticas de radioterapia sobre a morfologia, composição química e microdureza do esmalte e da dentina de dentes permanentes** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

**Introdução:** Padrões atípicos de cárie dentária em pacientes submetidos a radioterapia para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço podem estar associados aos efeitos da radiação sobre as glândulas salivares e tecidos dentários duros. Somados, podem contribuir para a cárie relacionada a radiação. Embora haja evidências sobre alterações sofridas pelos tecidos dentários duros após radioterapia, não há consenso na literatura sobre a gravidade destas alterações. **Objetivo:** avaliar a microestrutura, composição química e microdureza do esmalte e da dentina de dentes permanentes submetidos a doses terapêuticas de radioterapia *in vitro*. **Material e métodos:** estudo experimental, qualitativo, quantitativo e semiquantitativo. Foram obtidos fragmentos coronários de 24 terceiros molares. Constituiu-se 2 grupos: NI<sub>R</sub> (controle): formado por fragmentos de dentes não irradiados e IV<sub>T</sub> (irradiado): formado por fragmentos de dentes irradiados *in vitro* (2 Gy/dia 5 vezes por semana, totalizando 70 Gy). Os fragmentos foram submetidos a análise da microdureza (n=24), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (n=24), análise morfológica através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (n=19) e análise de elementos químicos por Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raio X (EDX) (n=19). As análises foram feitas antes e após a irradiação. Os dados foram testados para distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk,  $\alpha = 0,05$ ) e igualdade de variâncias (teste de Levene,  $\alpha = 0,05$ ), seguido de testes estatísticos paramétricos. Para a comparação das variáveis quantitativas foi



aplicado o teste T de Student. Um valor de  $p < 0,05$  (5%) foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** em relação as propriedades mecânicas observamos redução significativa da microdureza do esmalte e dentina após irradiação ( $p < 0,001$ ). A análise da composição química por FTIR mostrou que no esmalte não houve alteração da razão matriz/mineral (M:M) no grupo irradiado ( $p < 0,821$ ), mas houve redução significativa do teor relativo de carbonato (RCC) após irradiação ( $p < 0,039$ ). Na dentina observamos redução significativa da razão matriz/mineral (M:M) e carbonato/mineral (C:M) no grupo irradiado ( $p < 0,001$ ), enquanto a razão amida I/amida III, não sofreu alteração significativa após irradiação ( $p < 0,536$ ). Na análise de EDX realizadas no esmalte, não observamos variação no conteúdo de cálcio e fósforo após radiação, mas a razão Ca/P mostrou-se significativamente mais elevada no grupo irradiado ( $p < 0,001$ ). Na dentina, não houve alteração do teor de cálcio e fósforo, assim como da razão Ca/P após irradiação ( $p < 0,267$ ). A análise morfológica através de MEV pós irradiação, mostrou que no esmalte a maioria das amostras apresentaram uma alteração das características microestruturais com a presença de microporosidades, perda de padrões regulares das áreas prismáticas e interprismáticas e presença de áreas amorfas. Na dentina observamos manutenção do padrão de dentina peritubular e intertubular, com a presença de túbulos dentinários desobliterados e com a rede de fibras colágenas mais evidente grupo irradiado. **Conclusão:** as doses terapêuticas de radioterapia provocaram redução da microdureza, alterações na microestrutura e composição química do esmalte e da dentina. Assim, inferimos que doses terapêuticas de radiação exercem um impacto negativo sobre as propriedades mecânicas, químicas e micro-morfológicas dos tecidos dentários duros aumentando a vulnerabilidade destes tecidos à cárie relacionada a radiação.

**Palavras-chave:** 1. Radioterapia. 2. Esmalte Dentário. 3. Dentina. 4. Neoplasias de cabeça e pescoço.

## ABSTRACT

Farias, Maria mercês Aquino Gouveia Farias. **Effect of therapeutic doses of radiotherapy on the morphology, chemical composition, and microhardness of enamel and dentin of permanent teeth** [Tese]. São Paulo; Antônio Prudente Foundation; 2023.

**INTRODUCTION:** Atypical patterns of dental caries in patients undergoing radiotherapy to treat head and neck cancer may be associated with the effects of radiation on salivary glands and dental hard tissues. Together, they can contribute to radiation-related caries. Although there is evidence of changes in hard dental tissues after radiotherapy, there is no agreement in the literature on the severity of these changes. **PURPOSE:** This study aims to evaluate the microstructure, chemical composition, and microhardness of enamel and dentin in permanent teeth subject to therapeutic doses of *in vitro* radiotherapy. **MATERIAL AND METHODS:** This is an experimental, qualitative, quantitative, and semi-quantitative study. Coronal fragments were obtained from 24 third molars. Two groups were created: NI<sub>R</sub> (control), including fragments of non-irradiated teeth, and IV<sub>T</sub> (irradiated), including fragments of *in vitro* irradiated teeth (2Gy/day five times a week, totaling 70Gy). The fragments underwent microhardness analysis (n =24), Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR) (n=24), morphological analysis by Scanning Electron Microscope (SEM) (n=19), and analysis of chemical elements by Energy-dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX) (n=19). The analyses were performed before and after irradiation. Data were tested for normal distribution (Shapiro-Wilk test,  $\alpha = 0.05$ ) and equality of variances (Levene test,  $\alpha = 0.05$ ), followed by parametric statistical tests. The Student's T test was applied to compare the quantitative variables. A p-value  $< 0.05$  (5%) was considered statistically significant. **RESULTS:** Concerning the mechanical

properties, we observed a significant reduction in enamel and dentin microhardness after irradiation ( $p < 0.001$ ). The analysis of the chemical composition by FTIR showed no change in the mineral/matrix ratio (M:M) in enamel in the irradiated group ( $p < 0.821$ ), but there was a significant reduction in the relative carbonate content (RCC) after irradiation ( $p < 0.039$ ). In dentin, we observed a significant reduction in the mineral/matrix ratio (M:M) and carbonate/mineral ratio (C:M) in the irradiated group ( $p < 0.001$ ). In contrast, the amide I/amide III ratio showed no significant change after irradiation ( $p < 0.536$ ). In the EDX analysis performed on enamel, we did not observe any calcium and phosphorus content variation after radiation. However, the Ca/P ratio was significantly higher in the irradiated group ( $p < 0.001$ ). In dentin, there was no change either in calcium and phosphorus contents or in the Ca/P ratio after irradiation ( $p < 0.267$ ). The morphological analysis through SEM after irradiation showed that there is a loss in the characteristics of the enamel surface of most fragments, with the presence of microporosities, loss of regular patterns of the prismatic and interprismatic areas, and the presence of amorphous areas. In dentin, we observed maintenance of the peritubular and intertubular dentin patterns, with the presence of unobliterated dentinal tubules and with the most evident network of collagen fibers in the irradiated group. **CONCLUSION:** Therapeutic doses of radiotherapy caused a reduction in microhardness and changes in the microstructure and chemical composition of enamel and dentin. Thus, we conclude that therapeutic doses of radiation have a negative impact on the mechanical, chemical, and micro-morphological properties of hard dental tissues, increasing the vulnerability of these tissues to radiation-related caries.

**Key words:** 1. Radiotherapy. 2. Dental enamel. 3. Dentin. 4. Head and neck neoplasms.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fluxograma esquemático do desenho do estudo.....	9
<b>Figura 2</b>	Sequência de corte das coroas dentárias.....	10
<b>Figura 3</b>	Preparo dos fragmentos para MEV, EDX e FTIR.....	11
<b>Figura 4</b>	Preparo dos fragmentos para microdureza.....	12
<b>Figura 5</b>	Suporte para a irradiação das amostras e seu respectivo espelho.....	13
<b>Figura 6</b>	Preparo dos fragmentos para MEV.....	14
<b>Figura 7</b>	Microdureza .....	15
<b>Figura 8</b>	Representação gráfica das leituras de microdureza no esmalte e na dentina.....	16
<b>Figura 9</b>	Espectrofotometria- FTIR/ATR.....	18
<b>Figura 10</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo NI <sub>R</sub> (controle).....	27
<b>Figura 11</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo NI <sub>R</sub> (controle).....	27
<b>Figura 12</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo NI <sub>R</sub> (controle).....	28
<b>Figura 13</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo IV <sub>T</sub> (irradiado).....	29
<b>Figura 14</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo IV <sub>T</sub> (irradiado).....	29
<b>Figura 15</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo IV <sub>T</sub> (irradiado).....	30

<b>Figura 16</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo IV <sub>T</sub> (irradiado).....	30
<b>Figura 17</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo NI <sub>R</sub> (controle).....	31
<b>Figura 18</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo NI <sub>R</sub> (controle).....	32
<b>Figura 19</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo NI <sub>R</sub> (controle).....	32
<b>Figura 20</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo IV <sub>T</sub> (irradiado).....	33
<b>Figura 21</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo IV <sub>T</sub> (irradiado).....	34
<b>Figura 22</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo IV <sub>T</sub> (irradiado).....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Média e desvio-padrão dos valores de microdureza do esmalte nos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ).....	19
<b>Tabela 2</b>	Média e desvio-padrão dos valores de microdureza do esmalte nos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ).....	20
<b>Tabela 3</b>	Média e desvio-padrão dos valores de microdureza da dentina nos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ).....	20
<b>Tabela 4</b>	Média e desvio-padrão dos valores de microdureza da dentina nos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ).....	21
<b>Tabela 5</b>	Média e desvio padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P, Ca e Ca/P no esmalte do grupo controle (NI <sub>R</sub> ) obtida com EDX.....	21
<b>Tabela 6</b>	Média e desvio-padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P, Ca e Ca/P no esmalte do grupo irradiado (IV <sub>T</sub> ) obtida com EDX.....	22
<b>Tabela 7</b>	Média e desvio-padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P, Ca e Ca/P no esmalte dos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ) obtidos com EDX.....	22
<b>Tabela 8</b>	Média e desvio padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P, Ca e Ca/P na dentina do grupo controle (NI <sub>R</sub> ) obtida com EDX	23
<b>Tabela 9</b>	Média e desvio-padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P, Ca e Ca/P na dentina do grupo irradiado (IV <sub>T</sub> ) obtida com EDX.....	23

<b>Tabela 10</b>	Média e desvio-padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P, Ca e Ca/P na dentina dos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ) obtidos com EDX.....	24
<b>Tabela 11</b>	Média e desvio padrão da área integrada de cada componente químico do esmalte dentário nos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ).....	24
<b>Tabela 12</b>	Média e desvio padrão das razões M:M e RCC pela espectroscopia ART/FTIR do esmalte dentário nos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ).....	25
<b>Tabela 13</b>	Média e desvio padrão da área integrada de cada componente químico da dentina nos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ).....	25
<b>Tabela 14</b>	Média e desvio padrão das razões M:M, C:M, Al:AlIII, pela espectroscopia ART/FTIR da dentina nos grupos controle (NI <sub>R</sub> ) e irradiado (IV <sub>T</sub> ).....	26

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ATR</b>	Reflexão Total Atenuada (do inglês Internal Reflection Spectroscopy)
<b>CEPON</b>	Centro de Pesquisas Oncológicas
<b>C</b>	Carbono
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>Ca/P</b>	Razão Cálcio/fósforo
<b>CEP</b>	Conselho de Ética em Pesquisa
<b>C:M</b>	Razão carbonato/mineral
<b>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato
<b>DTGS</b>	Sulfato de Triglicina Deuterado
<b>EDX</b>	Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raio X (do inglês Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy- EDX)
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR).
<b>Gy</b>	Gray (1Gy=1 J/Kg)
<b>HPV</b>	Papiloma Vírus Humano (do inglês Human Papilloma Virus).
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IR</b>	Infravermelho
<b>IV<sub>T</sub></b>	Irradiado
<b>JAD</b>	Junção Amelo-Dentinária
<b>LCME</b>	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
<b>LEBm</b>	Laboratório de Engenharia BioMecânica
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura



<b>M:M</b>	Razão matriz orgânica/mineral
<b>NI<sub>R</sub></b>	Não Irradiado
<b>O</b>	Oxigênio
<b>P</b>	Fósforo
<b>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato
<b>RCC</b>	Teor relativo de carbonato
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>UNIVALI</b>	Universidade do Vale do Itajaí

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Câncer de cabeça e pescoço e cárie de radiação.....	1
1.2	Radiação ionizante.....	3
1.3	Caracterização do esmalte.....	4
1.4	Caracterização da dentina.....	5
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
2.1	Objetivo geral.....	7
2.2	Objetivos específicos.....	7
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>8</b>
3.1	Formação dos grupos.....	8
3.2	Preparo das amostras.....	10
3.2.1	Preparo dos fragmentos para Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV, Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raio X -EDX e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier -FTIR.	11
3.2.2	Preparo dos fragmentos para microdureza.....	12
3.3	Irradiação dos fragmentos.....	13
3.4	Análises dos fragmentos.....	14
3.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV.....	14
3.4.2	Espectroscopia de Dispersão de Energia-EDX.....	15
3.4.3	Microdureza.....	15

3.4.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier-FTIR...	16
3.5	Análise estatística.....	18
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	Microdureza.....	19
4.2	Espectroscopia de Dispersão de Energia- EDX.....	21
4.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier -FTIR..	24
4.4	Resultados morfológicos.....	26
4.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte - NI <sub>R</sub> (grupo controle)	26
4.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte - IV <sub>T</sub> - (grupo irradiado).....	28
4.4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina- NI <sub>R</sub> (grupo controle)	31
4.4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina- IV <sub>T</sub> - (grupo irradiado).....	33
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>56</b>
	<b>Anexo 1</b> Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	56

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO E CÁRIE DE RADIAÇÃO**

O câncer de cabeça e pescoço ou carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço ocupa a posição de sexto câncer mais comum no mundo (Sung et al. 2021). Em 2020, a incidência estimada de câncer de cabeça e pescoço acometendo cavidade oral, laringe e orofaringe alcançou 660.740 casos (Sung et al. 2021). No Brasil, o número estimado de novos casos de câncer da cavidade oral e laringe para cada ano do triênio 2020-2022 é de 17.670 casos em homens e de 5.190 em mulheres (Brasil, Ministério da Saúde, INCA 2019).

Apresenta como principais fatores de risco o tabagismo, etilismo, baixa ingestão de frutas e vegetais e infecção pelo papiloma vírus humano (HPV). Quando associados, o tabagismo e etilismo elevam e potencializam o risco (Marur, Arlene, Forastiere 2016; Gislou et al. 2022).

Fatores epidemiológicos, localização anatômica e estágio do câncer de cabeça e pescoço influenciam o prognóstico e as condutas terapêuticas, que abrangem uma combinação da ressecção cirúrgica do tumor primário e metástases regionais, radioterapia e quimioterapia. A radioterapia é um dos tratamentos adjuvantes mais empregados (Marur, Arlene, Forastiere 2016; Winkvist et al. 2017; Laura, Chow 2020).

A radioterapia é utilizada para tratar aproximadamente 80% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Ao atingir tecidos que não são o alvo do tratamento, muitos pacientes experimentarão toxicidades associadas à radiação, dentre estas, as mais frequentes são: perda de audição, mucosite, osteoradionecrose, disfagia, trismo, xerostomia, hipossalivação, cárie dentária e sensibilidade dentinária (Skiba-Tatarska 2016; Strojjan et al. 2017).

Recentemente tem sido empregado o termo agrupamento de sintomas orais, do inglês oral symptom clusters, para designar as toxicidades associadas ao tratamento do câncer de cabeça e pescoço. Juntos, provocam mudanças na dieta, dificuldade da higiene bucal, fragilidade do esmalte e ambiente bucal altamente cariogênico. Este cenário pode influenciar no risco de cárie relacionada a radiação (Gouvêa Vasconcellos et al. 2020).

Uma melhor compreensão do agrupamento de sintomas orais pode ter um significado clínico importante para a saúde bucal e a qualidade de vida dos pacientes com cárie relacionada a radiação. Assim, os protocolos contemporâneos de prevenção devem

vislumbrar um tratamento mais amplo do agrupamento de sintomas orais (Gouvêa Vasconcellos et al. 2020).

A cárie pós-irradiação ou cárie relacionada a radiação, apresenta um comportamento atípico, são de rápida progressão e altamente agressivas (Gupta et al. 2015; Gouvêa Vasconcellos et al. 2020). Acometem aproximadamente 30% dos pacientes pós-radioterapia de cabeça e pescoço e se desenvolve 6 a 12 meses após o tratamento (Palmier et al. 2020). Os primeiros sinais clínicos manifestam-se como uma descoloração preta/acastanhada da estrutura dentária e rachaduras no esmalte, seguida por delaminação do esmalte e exposição da dentina subjacente, podendo provocar a destruição de toda a coroa dentária (Palmier et al. 2020). O agravamento do quadro pode conduzir osteorradição necrose afetando negativamente a qualidade de vida do paciente (Gouvêa Vasconcellos et al. 2020; Palmier et al. 2020).

A literatura aponta que a formação de padrões recorrentes e atípicos de cárie dentária em dentes irradiados também pode está relacionada aos os efeitos diretos da radiação sobre os tecidos dentários duros, associados a pobre higiene bucal, ao aumento da dieta rica em carboidratos fermentáveis e às alterações da flora bacteriana (Lieshout, Bots 2014).

Estudos demonstraram que a radioterapia é capaz de afetar as propriedades químicas, morfológicas e biomecânicas do esmalte e dentina (Gupta et al. 2015; Palmier et al. 2020; Douchy et al. 2022), provocando diversas alterações sobre os tecidos dentários duros como: alteração do conteúdo mineral, orgânico/proteico do esmalte (Qing et al. 2015; Reed et al. 2015; Muñoz et al. 2020; Douchy et al. 2022) e da dentina (de Miranda et al. 2019), alterações nas propriedades nano-mecânicas da dentina e do esmalte (Liang et al. 2016), redução dos valores de microdureza do esmalte (de Barros da Cunha et al. 2017; Seyedmahmoud et al. 2017; Wu, Geng, Gao 2019; Muñoz et al. 2020; Douchy et al. 2022) e da dentina (Gonçalves et al. 2014; Hegde et al. 2015; Rodrigues et al. 2018; Wu et al. 2019), alterações morfológicas no esmalte (Madrid et al. 2017; Douchy et al. 2022) e na dentina (Gonçalves et al. 2014; Rodrigues et al. 2018; Douchy et al. 2022).

Tais mudanças nas propriedades mecânicas, morfológicas e na composição química podem contribuir potencialmente para a falha biomecânica da junção amelodentinária, levando a uma delaminação do esmalte que ocorre após a radioterapia, evento típico da cárie relacionada a radiação (Reed et al. 2015; Seyedmahmoud et al. 2017).

## 1.2 RADIAÇÃO IONIZANTE

Radiação ionizante é toda radiação capaz de provocar a ejeção de um ou mais elétrons dos orbitais de átomos ou moléculas de forma direta ou indireta. Isto é possível quando a energia da radiação é superior a energia de ligação dos elétrons de um átomo com seu núcleo. O resultado desta ejeção é a geração de íons e elétrons, o que chamamos de ionização (Hall, Giaccia 2012; Noouailhetas 2022).

As radiações ionizantes podem ser classificadas como eletromagnéticas, consideradas indiretamente ionizantes (raios X e raios gama) ou particuladas (elétrons, prótons), diretamente ionizantes (Hall, Giaccia 2012).

Na radiação diretamente ionizante, há energia cinética suficiente para produzir ionização por colisão podendo romper a estrutura atômica do meio absorvedor e gerar danos irreversíveis ao DNA e a proteínas como o colágeno (Hall, Giaccia 2012; Noouailhetas 2022).

Já na radiação indiretamente ionizante (raios X e gama) a interação dos fótons de raio X e gama com a matéria pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na primeira, um elétron resultante da absorção de um fóton de raio x interage diretamente com a matéria para produzir um efeito. Na segunda, o fóton de raio X interage com moléculas de água, quebrando-a e produzindo íons e radicais livres ( $\text{OH}^\cdot$ ), fenômeno conhecido como radiólise da água (Hall, Giaccia 2012). Os radicais livres são altamente reativos e interagem quimicamente entre si ou com moléculas próximas a eles, ou seja, com a matéria. Como consequência, novas moléculas podem ser danificadas, passando a disputar elétrons com o meio (Noouailhetas, 2022; Augusto Dias 2018) e desencadear reações químicas com outros compostos ou entre si podendo afetar as propriedades físicas e químicas dos materiais, ou seja, produzem um efeito biológico (Augusto Dias 2018).

Quando um átomo perde elétrons toda a estrutura molecular pode ficar comprometida pelo rearranjo instantâneo de elétrons, na busca de uma configuração mais estável. Esta busca pode resultar numa perda de identidade química para a molécula envolvida. O impacto da radiação ionizante sobre uma molécula específica (água, proteína, açúcar, DNA, RNA) e sua consequente transformação conduz a consequências que devem ser analisadas em função do papel biológico desempenhado pela molécula atingida (Noouailhetas 2022).

Nas radiações indiretamente ionizantes usadas na radioterapia, há predominância do efeito Compton, no qual o fóton de raios X interage com o elétron das camadas mais externas e parte da energia do fóton é dada ao elétron como energia cinética. O fóton, desviado de sua direção original, prossegue com comprimento de onda mais longo (ou seja, com energia reduzida), mas capaz de interagir com outros elétrons (Hall, Giaccia 2012).

Para o cálculo da absorção da radiação ionizante na radioterapia é utilizada a unidade gray (Gy) que é a unidade internacional de medida da radiação ionizante absorvida e é definida como a absorção de 1 J de radiação por 1 kg de matéria (Hall, Giaccia, 2012).

### 1.3 CARACTERIZAÇÃO DO ESMALTE

O esmalte dentário reveste externamente a coroa do elemento dentário e é o tecido mais duro e mineralizado do corpo humano. Por peso, 96% de sua estrutura é composta por conteúdo inorgânico, um fosfato de cálcio cristalino (hidroxiapatita) substituído por íons carbonato, hidroxiapatita carbonatada,  $[Ca_{10-x} Na_x (PO_4)_{6-y}(CO_3)(OH)_{2-u}F_u]$ . Sua composição química geral é  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . A apatita do esmalte pode ter diferentes substitutos para  $Ca^{2+}$  como  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  e para fosfato e hidroxila como  $CO_3^{2-}$ ,  $F^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$  e  $H_2O$ . As diferentes substituições são dependentes do meio não homogêneo sob o qual os cristais de esmalte crescem durante a mineralização dos dentes. O restante de sua estrutura é composta por 3% de água e menos de 1% de matriz orgânica (Bachmann, Craievich, Zezell 2004; Shellis, Feasterstone, Lussi 2014; Duverger, Beniash, Morasso 2016; Nanci 2018b). Embora a matriz orgânica esteja presente em pequena quantidade no esmalte maduro, desempenha um papel crucial em suas propriedades biomecânicas (Duverger, Beniash, Morasso 2016).

A característica mais dominante do esmalte na escala microscópica são os prismas de esmalte que se estendem desde a fina camada de esmalte aprismático, junto a junção amelodentinária até a superfície, onde há algumas áreas aprismáticas. Cada prisma é formado por estruturas nanocristalinas de apatita, medindo 60 a 70 nm de largura e 25 a 30 nm de espessura, que estão organizadas paralelamente umas às outras, seguindo o longo eixo do prisma e mantidas unidas por proteínas não colágenas. O esmalte localizado entre os prismas é denominado interprismático, também composto por cristais de apatita dispostos em uma orientação diferente das áreas prismáticas (Duverger, Beniash, Morasso 2016; Nanci 2018b).

A diferença de orientação é significativa em torno de aproximadamente três quartos da circunferência de um prisma. O limite entre as áreas de esmalte prismático e interprismático denomina-se bainha do prisma e concentra boa parte da matriz orgânica do esmalte (Arola et al. 2017; Nanci 2018b).

Ao longo de uma pequena porção da circunferência do prisma os cristais são confluentes com os do esmalte interprismático. Nesta região, não há a presença da bainha do prisma, sendo assim, não há separação entre as áreas prismática e interprismática (Nanci 2018b).

#### 1.4 CARACTERIZAÇÃO DA DENTINA

A dentina madura é um tecido mineralizado duro, elástico e avascular que suporta o esmalte e envolve a câmara pulpar e canais radiculares. É composta de aproximadamente 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água. A fase mineral na dentina consiste principalmente de hidroxiapatita carbonatada  $(Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-y}(CO_3)_{x+y})$ ,  $(0 \leq X \leq 6, 0 \leq Y \leq 2)$  na forma de pequenos cristais. A fase orgânica compreende cerca de 90% de colágeno (principalmente tipo I com pequenas quantidades de tipos III e V) e várias proteínas não colagenosas (fosfoproteína/fosfoforina de dentina, sialoproteína de dentina, glicoproteína de dentina, proteína da matriz de dentina-1, osteonectina, proteína secretada ácida e rica em cisteína, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina, fosfoglicoproteína da matriz extracelular, proteoglicanos e algumas proteínas séricas) e lipídios (Goldberg et al. 2011; Xu, Wang 2012; Nanci 2018a).

O colágeno tipo I atua como um andaime que acomoda uma grande proporção (estimada em 56%) do mineral nos orifícios e poros das fibrilas. As proteínas da matriz não colágena regulam a deposição mineral e podem atuar como inibidores, promotores e/ou estabilizadores (Nanci 2018a).

A matriz colagenosa se organiza na forma de fibras, fibrilas e microfibrilas. A fibrila de colágeno é formada por feixes de microfibrilas reticuladas dispostas pelo escalonamento das moléculas de colágeno, com áreas de “gaps” e de sobreposição, ligadas entre si através de ligações cruzadas covalentes. As propriedades mecânicas do colágeno dependem de um mecanismo altamente regulado de ligações cruzadas intra e intermoleculares afetando a estabilidade da matriz. As fibras de colágeno são reforçadas pela mineralização de cristais de



fosfato de cálcio, depositados dentro das fibras de colágeno ou entre as elas (Nanci 2018a; Slimani et al. 2017).

A matriz extracelular é supersaturada em relação aos íons cálcio e fosfato, o que favorece a nucleação do mineral e seu subsequente crescimento e desenvolvimento na forma de pequenos cristais em forma de plaquetas associados à proteína. Esse fenômeno ocorre tanto dentro do colágeno, (mineralização intrafibrilar) quanto fora do colágeno (mineralização extrafibrilar). Na primeira, os cristais dispõem-se alinhados e altamente orientados em relação aos eixos longos do colágeno. Na segunda, formam anéis que são gerados como consequência da orientação aleatória do mineral em relação ao colágeno através da ligação de íons cálcio e fosfato com as cadeias laterais de aminoácidos do colágeno (Nanci 2018a).

Estruturalmente a dentina é formada por túbulos dentinários que atravessam toda a extensão da dentina desde a junção amelo-dentinária. Na dentina coronal, seguem um caminho sinuoso até a periferia da polpa. Os túbulos dentinários são estruturas afiladas, apresentam uma luz maior perto da polpa e menor nas proximidades da junção amelodentinária. Eles se comunicam através de um profuso sistema canalicular anastomosado. A natureza tubular da dentina lhes confere grande permeabilidade (Goldberg et al. 2011; Xu, Wang 2012; Nanci 2018a).

Os túbulos são delimitados internamente por um colar de matriz hipermineralizado chamado dentina peritubular, que contém pouco colágeno em sua estrutura (Goldberg et al. 2011; Xu, Wang 2012; Nanci 2018a).

A dentina localizada entre os túbulos dentinários é chamada de dentina intertubular. Consiste em uma rede firmemente entrelaçada de fibrilas de colágeno tipo I (50 a 200 nm de diâmetro) em torno da qual os cristais de apatita são depositados. A substância fundamental consiste em proteínas de matriz não colagenosas e algumas proteínas plasmáticas (Goldberg et al 2011; Xu, Wang 2012; Nanci 2018a).

Embora haja evidências sobre alterações estruturais sofridas pelos tecidos dentários duros após radioterapia, não há consenso na literatura sobre a gravidade e extensão destas alterações. A ampliação do conhecimento sobre os possíveis efeitos da radioterapia sobre os tecidos dentários duros, pode contribuir para a busca de soluções que minimizem estas alterações e seus impactos na vida dos indivíduos com câncer de cabeça e pescoço.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a microestrutura, composição química e microdureza do esmalte e da dentina de dentes permanentes submetidos a doses terapêuticas de radioterapia *in vitro*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a microestrutura do esmalte e da dentina de dentes permanentes através de Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV antes e após irradiação;

Identificar os elementos químicos presentes na superfície esmalte e da dentina de dentes permanentes por Espectroscopia de Dispersão de Energia-EDX antes e após irradiação;

Mensurar a microdureza do esmalte e da dentina antes e após irradiação;

Analisar a constituição proteica e mineral do esmalte e da dentina através de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier-FTIR antes e após irradiação.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade do Vale do Itajaí-UNIVALI e instituições coparticipantes: Fundação Antônio Prudente/ A. C. Camargo Cancer Center e Centro de Pesquisas Oncológicas- CEPON e aprovado sob o parecer: 5.467.402 (**Anexo 1**).

Trata-se de um estudo experimental, qualitativo, quantitativo e semiquantitativo.

Os dentes humanos terceiros molares concedidos para esta pesquisa foram obtidos através da constituição de um biorrepositório atrelado a este projeto de pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por parte do concedente, que não poderia ter se submetido a tratamento radioterápico. Foram coletados 78 dentes. Estes foram analisados com uma lupa e foram selecionados para este estudo 24 dentes hígidos que não apresentavam falhas, trincas ou defeitos estruturais.

No período de coleta os dentes foram estocados em solução de formol tamponada a 10% (Madrid et al. 2017).

Cada uma das 24 coroas foi seccionada em 4 partes, dando origem a 96 fragmentos, dos quais, 67 foram utilizados para as análises.

Foram constituídos 2 grupos:

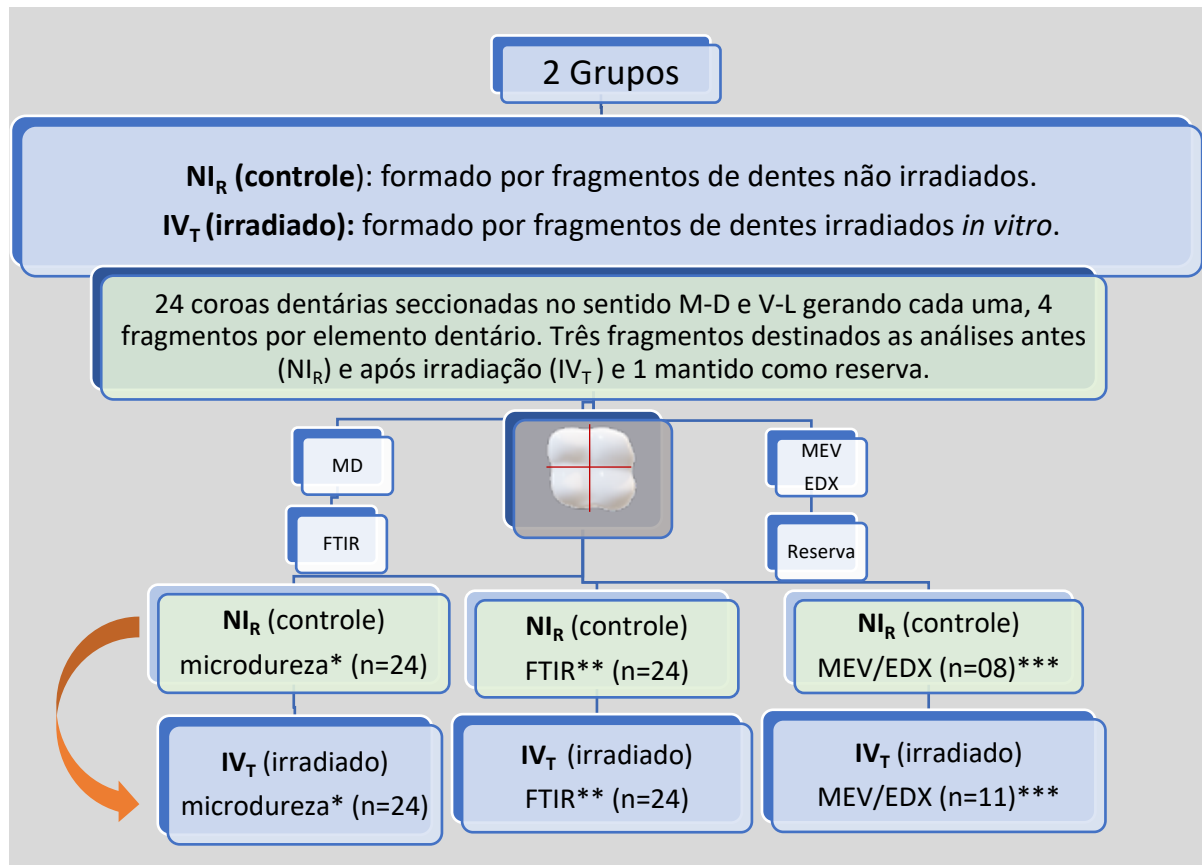
- NI<sub>R</sub> (controle): formado por fragmentos de dentes não irradiados.
- IV<sub>T</sub> (irradiado): formado por fragmentos de dentes irradiados *in vitro*.

Para a realização das análises, os fragmentos foram distribuídos, levando-se em consideração que cada um dos 3 fragmentos originados de uma mesma coroa deveria ser submetido as diferentes análises, a saber:

Análise de microdureza (n=24) e análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy- FTIR (n=24). Nestas 2 análises foram usados os mesmos fragmentos nos respectivos métodos, antes (NI<sub>R</sub>- grupo controle) e após a irradiação (IV<sub>T</sub>- grupo irradiado).

Para a análise morfológica através de Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV e análise de elementos químicos por Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raio X do inglês

Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy-EDX, 8 fragmentos foram analisados antes ( $NI_R$ - grupo controle) e 11 fragmentos foram analisados após a irradiação ( $IV_T$ - grupo irradiado). Nestas 2 análises foram usados fragmentos diferentes, antes ( $NI_R$ - grupo controle) e após a irradiação ( $IV_T$ - grupo irradiado) (**Figura 1**).

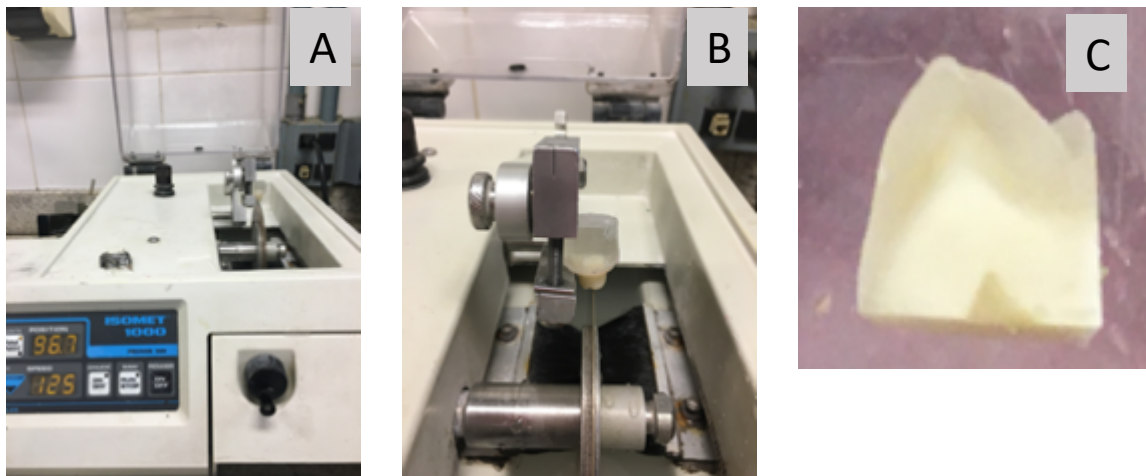


Fonte: própria autora.

**Figura 1** - Fluxograma esquemático do desenho do estudo. (MD): Microdureza. (FTIR): Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier. (MEV): Microscopia Eletrônica de Varredura. (EDX): Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raio X. (\*): mesmo fragmento antes e após irradiação. (\*\*): mesmo fragmento antes e após irradiação. (\*\*\*) : fragmentos diferentes analisados antes da irradiação e após irradiação.

### 3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para obtenção dos fragmentos coronários, no centro de cada coroa dentária foi realizado um corte no sentido mésio–distal e outro no sentido vestibulo-lingual utilizando um disco diamantado dupla face na velocidade de 125 rpm (Buehler Wafering Blades, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) acoplado a uma cortadora metalográfica de alta precisão, sob refrigeração constante com água (Isomet 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA). Após os cortes, a porção coronária foi separada da porção radicular, obtendo-se 4 fragmentos, dos quais, 3 foram utilizados para leituras de microdureza, FTIR e MEV/EDX nos grupos NI<sub>R</sub> (controle) e IV<sub>T</sub> (irradiado) e 1 mantido como reserva (**Figura 2**).



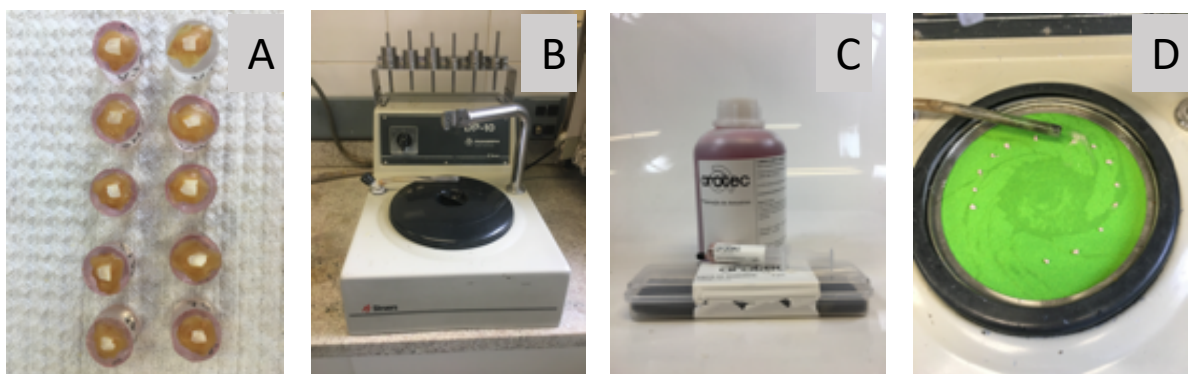
**Figura 2** - Sequência de corte das coroas dentárias. (A): Cortadora metalográfica de alta precisão IsoMet. (B): Dente embutido em resina, fixado e posicionado em cortadora. (C): Fragmento (superfície analisada) obtido após o corte longitudinal da coroa demonstrando a integridade do esmalte e da dentina.

Três dos fragmentos obtidos de cada elemento dentário foi aplainado e polido. Primeiramente, a face selecionada para as leituras foi colada com cera pegajosa (Newwax, Technew Com. Ind. Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) em um suporte cilíndrico feito com resina poliéster (Resina Cristal, Mundo das Fibras, Itajaí, Brasil), com o objetivo de planificar a face oposta à das leituras e obter paralelismo entre as faces. Realizou-se a planificação da superfície oposta utilizando papel de carboneto de silício com granulação 400 (Norton, Saint-Gobain do Brasil Prod. Ind. e para Constr. Ltda., Guarulhos, Brasil) acoplado em uma politriz (Model DP-10, Struers/Panambra Industrial e Técnica Ltda., São Paulo, SP, Brasil), refrigerada a água, durante 30 segundos.

Subsequentemente, os fragmentos foram descolados e novamente aderidos com cera pegajosa nos cilindros de resina com a finalidade de polir a face reservada para as leituras de MEV, EDX, FTIR e microdureza.

### 3.2.1 Preparo dos fragmentos para Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV, Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raio X -EDX e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier -FTIR.

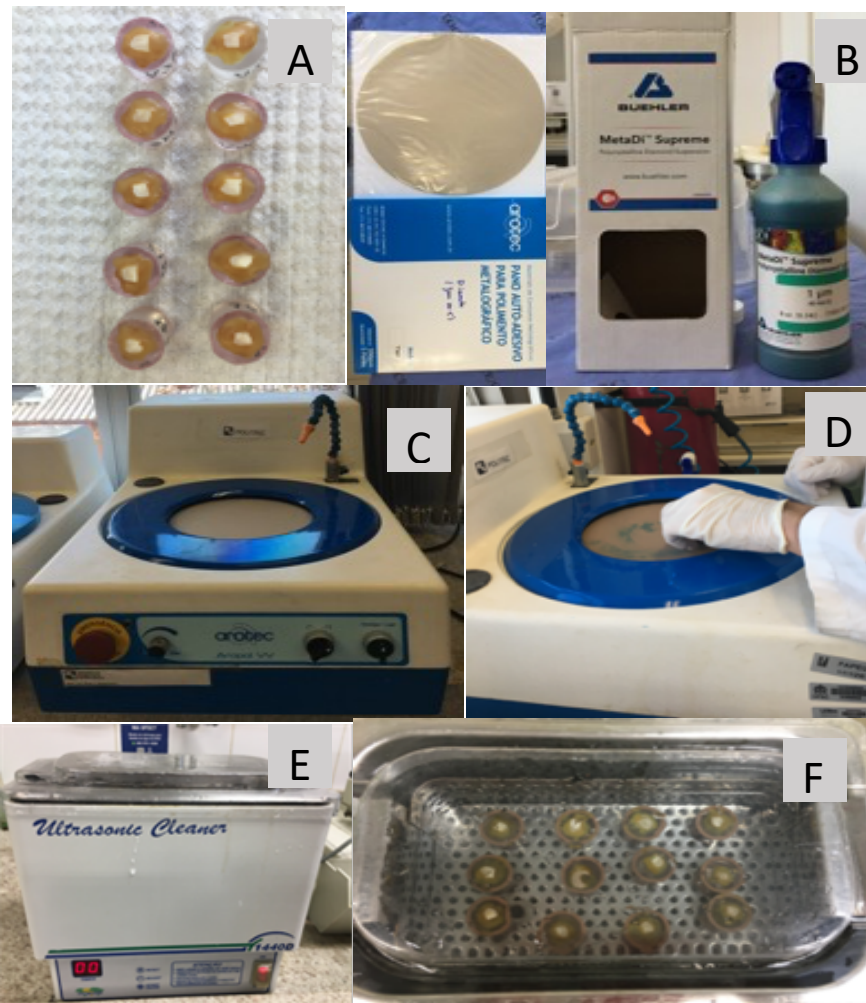
O polimento da face de leitura foi realizado na politriz (DP-10- Pananbra) sob refrigeração constante com água, usando papel de carboneto de silício com granulações 600 e 1200 durante 30 segundos cada. Sequencialmente foi utilizado um pano para polimento verde (MOD FVL DIAM 200 mm, AROTEC S/A Ind. e Comércio-Cotia, São Paulo, Brasil) umedecido com lubrificante (LUBRIFICANTE VERMELHO MOD. LV - NAO-FERROSOS, AROTEC S/A Ind. e Comércio-Cotia, São Paulo, Brasil) e pasta de diamante de 1  $\mu\text{m}$  (MOD. P D1S, AROTEC S/A Ind. e Comércio-Cotia, São Paulo, Brasil) durante 2 minutos (**Figura 3**). Ao final desta etapa, todas os fragmentos receberam um banho com água duplamente deionizada por 30 minutos em um limpador ultrassônico (Ultrasonic Cleaner-1440D) para remover quaisquer detritos. Os fragmentos foram conservados em água deionizada sob refrigeração à 4°C até a realização das leituras. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Bucal do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.



**Figura 3** - Preparo dos fragmentos para MEV, EDX e FTIR. (A): Amostras montadas em cilindros de resina. (B): Politriz. (C): Pasta de diamante e solução lubrificante. (D): Pano para polimento.

### 3.2.2 Preparo dos fragmentos para microdureza

Para a obtenção de uma superfície plana e polida, os fragmentos foram aplainados numa politriz (DP-10- Pananbra) sob refrigeração constante, usando sequencialmente papel de carboneto de silício com granulações 600 e 1200 durante 30 segundos cada. Para o polimento da superfície foi utilizado um pano para polimento (AROTEC- MOD TWI DIAM 200 mm) aderido ao disco da politriz (Aropol VV- Arotec Ind. e Com., Cotia, São Paulo, Brasil) umedecido com uma suspensão de diamante 1  $\mu\text{m}$  (MetaDi™ Supreme- BUEHLER) durante 2 minutos. Ao final desta etapa todas os fragmentos receberam um banho com água duplamente deionizada por 30 minutos em um limpador ultrassônico (Ultrasonic Cleaner-1440D) para remover possíveis detritos. As amostras foram conservadas em água deionizada sob refrigeração à 4°C até a realização das leituras (**Figura 4**) (Gonçalves et al. 2014). Estes procedimentos foram realizados no laboratório de Engenharia BioMecânica- LEBm da UFSC.



**Figura 04** - Preparo dos fragmentos para microdureza. (A): Amostras montadas. (B): Pano para polimento e suspensão de diamante. (C) e (D): Politriz. (E): Limpador ultrassônico. (F): Banho de imersão.

### 3.3 IRRADIAÇÃO DOS FRAGMENTOS

Os fragmentos do grupo IV<sub>T</sub> (irradiado) receberam radiação ionizante por um acelerador linear (Clinac 2100 C Varian®, Palo Alto, CA, EUA) com fótons de 6 MV. A irradiação foi realizada no Serviço de Radioterapia do Centro de Pesquisas Oncológicas-CEPON da cidade de Florianópolis.

A unidade gray (Gy) é a unidade internacional de medida da radiação ionizante absorvida e é definida como a absorção de 1 J de radiação por 1 kg de matéria e é a referência utilizada para o cálculo da dose de radioterapia (Hall, Giaccia, 2012).

A fim de simular a radioterapia de cabeça e pescoço no grupo IV<sub>T</sub> (irradiado) a terapia radioterápica foi fracionada em 2 Gy por dia, 5 vezes por semana, até a dose total de 70Gy (35 frações ao longo de 7 semanas) (Reed et al. 2015; Bordignon 2020). Foi utilizada uma distância de 100 cm entre a fonte de radiação e os fragmentos (Liang et al. 2016). Dosímetros foram usados para controlar a administração da radioterapia em cada fragmento. Os fragmentos foram acondicionados em um mesmo dispositivo contendo água deionizada durante a radioterapia e entre os ciclos de radiação (**Figura 9**). (de Barros da Cunha et al. 2017).

MD 1	MD 2	MD 3	MD 4	MD 5		FTIR 1	FTIR 2	FTIR 3	FTIR4	FTIR 5	MEV13	MEV14	MEV15	MEV16
MD 6	MD 7	MD 8	MD 9	MD 10		FTIR 6	FTIR 7	FTIR 8	FTIR 9	FTIR10	MEV17	MEV18	MEV19	MEV20
MD 11	MD 12	MD 13	MD 14	MD 15		FTIR11	FTIR12	FTIR13	FTIR14	FTIR15		X	MEV21	MEV22
MD 16	MD 17	MD 18	X	MD 19	MD 20	FTIR16	FTIR17	FTIR18	FTIR19	FTIR20		X	MEV25	MEV26
MD 21	MD 22	MD 25	X	MD 26		FTIR21	FTIR22	FTIR25	FTIR26					



**Figura 5** - Suporte para a irradiação das amostras e seu respectivo espelho. (A): Dispositivo com as amostras imersas em água prontas para irradiação.

Após conclusão da irradiação os fragmentos foram retirados do suporte e através de um espelho previamente confeccionado como marcador da localização de cada fragmento, estas foram montadas novamente e armazenadas em água deionizada para compor o grupo IV<sub>T</sub> (irradiado) e seguir para a avaliação morfológica MEV/EDX, testes de microdureza e FTIR.



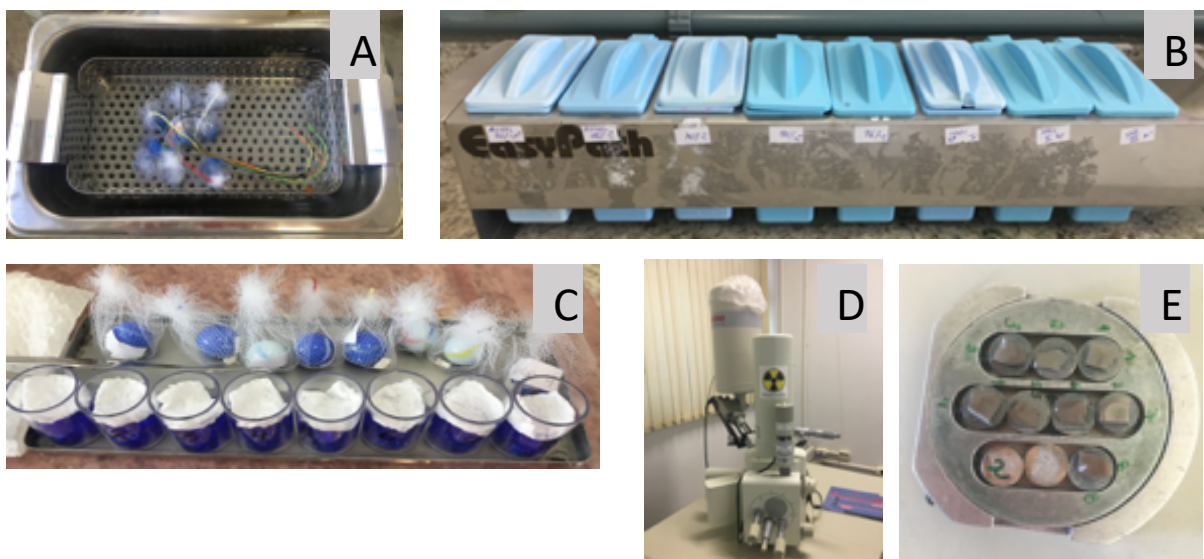
### 3.4 ANÁLISES DOS FRAGMENTOS

#### 3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV.

Os fragmentos foram inicialmente fixados em uma solução de 2,5% glutaraldeído tamponado com cacodilato de sódio 0,1 M durante 24 h a 4 °C. Em seguida foram lavados em uma solução de 0,1M cacodilato de sódio e limpos por 10 minutos em banho ultrassônico (UltrasonicCleaner T-1449-D. Odontobrás Ind. e Com, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com água deionizada. Após esta etapa foram desidratados em banhos sequenciais de etanol por 5 minutos cada (30%, 50%, 70%, 90%, 96%) e 3 banhos de 10 minutos (álcool 100%). Os fragmentos foram armazenados em um receptáculo contendo sílica azul por 24 horas. Posteriormente, foram fixados em discos de metal com fita adesiva dupla face e a superfície coberta com carbono (de Barros da Cunha et al. 2017) (**Figura 5**).

Os fragmentos foram analisados em um Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica-LCME da Universidade Federal de Santa Catarina. Foi utilizada uma tensão aceleradora de 10kV com magnificações de 500X, 1.000X, 5.000 X, 10.000X e 20.000X.

No esmalte foram analisadas áreas representativas de esmalte prismático e esmalte interprismático (da Cunha et al. 2017; Madrid et al. 2017). No tecido dentinário áreas de dentina peritubular e intertubular (Gonçalves et al. 2014). As análises foram realizadas nos grupos NI<sub>R</sub> (controle) antes da irradiação e IV<sub>T</sub> (irradiado) após irradiação *in vitro*.



**Figura 6** - Preparo dos fragmentos para MEV. (A): Banho ultrassônico. (B): Banhos sequenciais em álcool. (C): Reservatório de sílica. (D): Microscópio eletrônico de varredura. (E): Amostras preparadas para leitura.

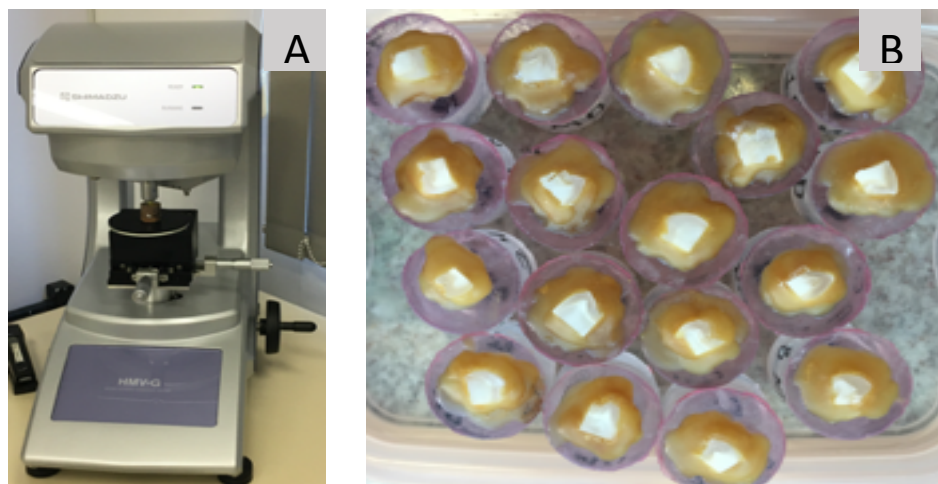
### 3.4.2 Espectroscopia de Dispersão de Energia-EDX.

Nos fragmentos submetidos a MEV foi realizada a análise composicional do esmalte e da dentina identificando os elementos químicos carbono (C), oxigênio (O), cálcio (Ca) e fósforo (P) (da Cunha et al. 2017) utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica-LCME da Universidade Federal de Santa Catarina- Florianópolis.

### 3.4.3 Microdureza

A mensuração da microdureza Vickers no esmalte e na dentina foi realizada utilizando um microdurômetro (SHIMADZU- HMV-G, Kyoto, Japão) com um indentador de diamante com ponta piramidal (**Figura 6**), nos grupos NI<sub>R</sub> (controle), antes da irradiação e grupo IV<sub>T</sub> (irradiado), após irradiação *in vitro*.

As leituras foram realizadas no Laboratório de Engenharia Biomecânica (LEBm) da Universidade Federal de Santa Catarina- Florianópolis.



**Figura 7 - Microdureza.** (A): Microdurômetro. (B): Amostras prontas para as leituras de microdureza.

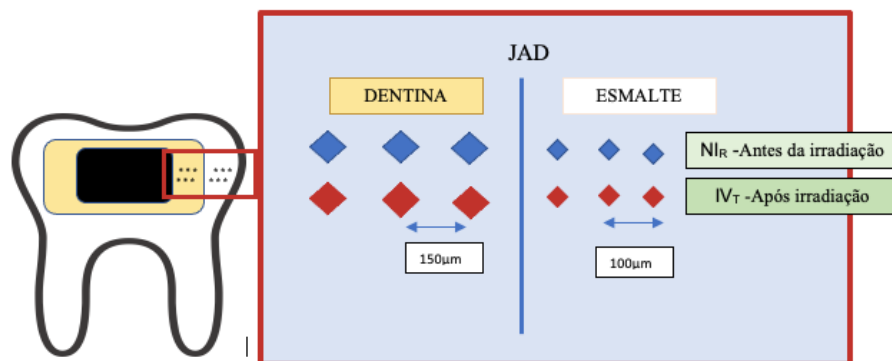
Para as leituras em esmalte foi utilizada uma de carga de 50g durante 15 segundos e para a dentina uma carga de 50g por 10 segundos.

O valor de dureza Vickers depende da força aplicada (F) e do tamanho da diagonal da indentação (L) gerada na amostra:

$$HV = 1,8544 \frac{F}{L^2}$$

Onde HV é o número de microdureza Vickers em Pascal [Pa], F é a pressão em gf (grama de força) e L é o comprimento diagonal em  $\mu\text{m}$  (Kudkuli et al. 2020).

Em cada tecido foram realizadas 3 mensurações. No esmalte a primeira indentação foi distante 50  $\mu\text{m}$  da JAD (junção amelo-dentinária) e as demais espaçadas em intervalos de 100  $\mu\text{m}$ . Na dentina, a primeira indentação foi distante 50  $\mu\text{m}$  da JAD e as demais espaçadas em intervalos de 150  $\mu\text{m}$  (Gonçalves et al. 2014). Todas as mensurações foram executadas pelo mesmo examinador calibrado. Os valores representativos da microdureza da dentina e do esmalte para cada fragmento foram obtidos como a média dos resultados das três indentações (Gonçalves et al. 2014) (**Figura 7**).



Fonte: autoria própria.

**Figura 8** - Representação gráfica das leituras de microdureza no esmalte e na dentina

#### 3.4.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier-FTIR

A análise dos elementos químicos nos fragmentos foi realizada através de ATR/FTIR (IRSpirit- Fourier Transform Infrared Spectrophotometer- Shimadzu, Tokyo, Japan). A unidade ATR/FTIR continha um detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS).

Os fragmentos foram posicionados contra o cristal de diamante da unidade ATR/FTIR e pressionados com força e pressão constante para facilitar o contato (**Figura 08**). Os

espectros foram registrados na faixa de 400 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Cada amostra foi escaneada 32 vezes e o espectro final adquirido foi a média dessas varreduras. Os espectros foram registrados e analisados pelo software OPUS 6.5 (Bruker, Ettlingen, DEU) (de Miranda et al. 2021).

No esmalte, após a correção e normalização da linha de base, a área sob cada banda foi integrada usando as ferramentas apropriadas do software. Cada espectro foi normalizado de acordo com a banda de fosfato (1.190 - 702  $\text{cm}^{-1}$ ). Os espectros de FTIR foram analisados calculando os seguintes parâmetros:

- Razão matriz orgânica/ mineral (M:M), expressa a razão entre as áreas integradas da proteína amida I (1.655  $\text{cm}^{-1}$ ) e o modo de alongamento do fosfato v1, v3 (960 e 1.040  $\text{cm}^{-1}$ );

- Teor relativo de carbonato (RCC), expressa a razão das áreas integradas dos dois picos de carbonato mais fortes v3 em 1.460 e 1.425  $\text{cm}^{-1}$  e o modo de alongamento de fosfato v1, v3.

No esmalte, M: M representa a quantidade de matriz orgânica em relação à matriz inorgânica, e RCC avalia a extensão de carbonato incorporado na hidroxiapatita (de Miranda et al. 2019; Lopes et al. 2018).

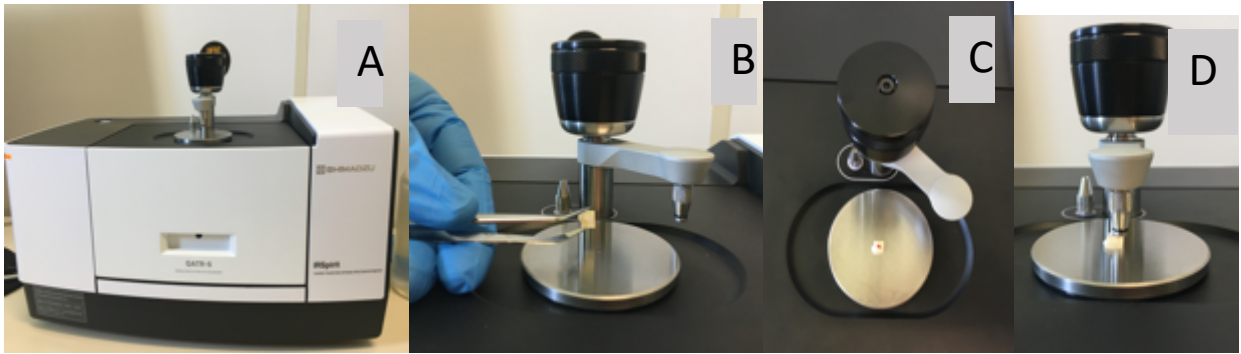
Na dentina operou-se os mesmos procedimentos e após a correção e normalização da linha de base, os espectros de FTIR foram analisados calculando os seguintes parâmetros:

- Razão mineral/matriz M: M (a razão de banda entre  $\sim 1035$  e  $\sim 1655$   $\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1035} / A_{1655}$ ), atribuída a vibração v1, v3 do íon fosfato e o alongamento C = O da amida de colágeno I, respectivamente;

- Razão carbonato / mineral C: M (a razão das áreas integradas de carbonato v2 a 872  $\text{cm}^{-1}$  para o fosfato v1, v3 a 1035  $\text{cm}^{-1}$ );

- Razão amida I / amida III (a razão das áreas integradas da amida I a 1655  $\text{cm}^{-1}$  para a amida III a 1235  $\text{cm}^{-1}$ ) (de Miranda et al., 2019).

As análises foram realizadas no laboratório de Materiais Avançados da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Araranguá.



**Figura 9** - Espectrofotometria- FTIR/ATR. (A): Espectrofotômetro. (B): Amostras para FTIR. (C e D): Amostra posicionada para leitura.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados para distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk,  $\alpha = 0,05$ ) e igualdade de variâncias (teste de Levene,  $\alpha = 0,05$ ), seguido de testes estatísticos paramétricos. Para a comparação das variáveis quantitativas foi aplicado o teste T de Student. Um valor de  $p < 0,05$  (5%) foi considerado estatisticamente significativo. O software estatístico SPSS versão 23.0 foi utilizado para as análises.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 MICRODUREZA

Os valores de microdureza do esmalte são apresentados na **Tabela 1**. Na comparação entre os grupos observou-se redução significativa dos valores de microdureza no grupo IV<sub>T</sub> (irradiado) ( $p < 0,001$ ) (**Tabela 2**).

**Tabela 1-** Média e desvio-padrão dos valores de microdureza do esmalte nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>).

Amostras	Grupo NI <sub>R</sub> (controle)		Grupo IV <sub>T</sub> (irradiado)	
	Média	± DP	Média	± DP
Esmalte/1	299,67	± 29,67	290,7	± 23,18
esmalte/ 2	313,33	± 20,31	271,3	± 7,02
esmalte/ 3	249,00	± 6,56	286,7	± 3,51
esmalte/ 4	327,33	± 12,90	334,3	± 3,51
esmalte/ 5	361,33	± 6,66	299,3	± 8,50
esmalte/ 6	333,67	± 18,01	301,3	± 9,24
esmalte/ 7	339,33	± 27,61	302,7	± 8,50
esmalte/ 8	316,67	± 21,22	221,0	± 23,58
esmalte/ 9	346,67	± 20,01	266,7	± 9,71
esmalte/ 10	301,00	± 1,73	289,7	± 22,85
esmalte/ 11	337,33	± 15,01	266,3	± 31,56
esmalte/ 12	295,67	± 10,97	311,0	± 18,03
esmalte/ 13	339,67	± 5,69	263,0	± 25,24
esmalte/ 14	322,33	± 29,14	341,0	± 9,54
esmalte/ 15	319,00	± 17,44	245,7	± 8,74
esmalte/ 16	224,33	± 11,59	289,3	± 17,01
esmalte/ 17	305,00	± 8,54	264,0	± 13,86
esmalte/ 18	268,33	± 10,02	267,3	± 2,89
esmalte/ 19	302,67	± 55,90	248,7	± 17,01
esmalte/ 20	311,00	± 19,08	282,3	± 32,72
esmalte/ 21	338,33	± 11,50	256,3	± 17,24
esmalte/ 22	347,33	± 6,11	342,0	± 4,00
esmalte/ 23	314,33	± 16,26	322,0	± 26,85
esmalte/ 24	357,67	± 17,04	274,0	± 1,73
<b>Média total</b>	<b>315,46</b>	<b>± 36,20</b>	<b>284,86</b>	<b>± 33,42</b>

Fonte: Autoria própria

**Tabela 2-** Média e desvio-padrão dos valores de microdureza do esmalte nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>).

Grupos	NI <sub>R</sub> (controle)	IV <sub>T</sub> (irradiado)	Valor de p
Média ± DP	315,46 ± 36,20	284,86 ± 33,42	p<0,001*

**Fonte:** Autoria própria. (\*): Indica uma diferença significativa em relação ao grupo NI<sub>R</sub> (p<0,05).

Os valores de microdureza da dentina são apresentados na **Tabela 3**. Na comparação entre os grupos observou-se redução significativa no grupo IV<sub>T</sub> (irradiado) (p<0,001) (**Tabela 4**).

**Tabela 3-** Média e desvio-padrão dos valores de microdureza da dentina nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>).

Amostras	Grupo NI <sub>R</sub> (controle)		Grupo IV <sub>T</sub> (irradiado)	
	Média	± DP	Média	± DP
dentina/1	56,43	± 5,48	29,43	± 5,48
dentina/ 2	66,47	± 1,42	24,67	± 1,42
dentina/ 3	59,23	± 8,56	26,80	± 8,56
dentina/ 4	61,23	± 1,46	25,00	± 1,46
dentina/ 5	68,37	± 2,67	29,60	± 2,67
dentina/ 6	66,63	± 5,20	22,30	± 5,20
dentina/ 7	62,47	± 2,16	22,57	± 2,16
dentina/ 8	65,23	± 5,88	32,83	± 5,88
dentina/ 9	68,83	± 6,27	27,20	± 6,27
dentina/ 10	69,30	± 4,03	30,03	± 4,03
dentina/ 11	70,33	± 3,29	22,97	± 3,29
dentina/ 12	66,53	± 7,33	34,90	± 7,33
dentina/ 13	68,77	± 3,36	27,13	± 3,36
dentina/ 14	70,50	± 4,51	25,97	± 4,51
dentina/ 15	65,70	± 2,26	31,37	± 2,26
dentina/ 16	58,47	± 1,43	26,17	± 1,43
dentina/ 17	58,27	± 1,95	24,30	± 1,95
dentina/ 18	60,57	± 1,50	22,13	± 1,50
dentina/ 19	58,53	± 2,12	29,23	± 2,12
dentina/ 20	63,63	± 2,32	23,07	± 2,32
dentina/ 21	64,07	± 2,34	22,13	± 2,34
dentina/ 22	65,97	± 5,05	26,77	± 5,05
dentina/ 23	70,40	± 4,61	31,70	± 4,61
dentina/ 24	62,97	± 1,88	23,97	± 1,88
<b>Média total</b>	<b>64,54</b>	<b>± 5,47</b>	<b>26,76</b>	<b>± 4,15</b>

**Fonte:** Autoria própria

**Tabela 4-** Média e desvio-padrão dos valores de microdureza da dentina nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>).

Grupos	NI <sub>R</sub> (controle)	IV <sub>T</sub> (irradiado)	Valor de p
Média ± DP	64,54 ± 5,47	26,76 ± 4,15	p<0,001*

**Fonte:** Autoria própria. (\*): Indica uma diferença significativa em relação ao grupo NI<sub>R</sub> (p<0,05%).

#### 4.2 ESPECTROSCOPIA DE DISPERSÃO DE ENERGIA-EDX

As **Tabelas 5 e 6** exibem os resultados da Espectroscopia de Dispersão de Energia-EDX para o esmalte nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>), respectivamente.

Observou-se uma redução significativa do elemento carbono (C) (p<0,001) e elevação da razão Ca/P (p<0,001) no grupo irradiado (IV<sub>T</sub>) (**Tabela 7**). Os demais elementos não mostraram variação significativa entre os grupos.

**Tabela 5-** Média e desvio padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P e Ca e Ca/P no esmalte do grupo controle (NI<sub>R</sub>) obtida com EDX.

Amostras	C	O	P	Ca	Ca/P
A1NI <sub>R</sub>	7,86	24,48	17,95	49,71	2,77
02 NI <sub>R</sub>	7,52	32,43	16,2	43,85	2,71
03 NI <sub>R</sub>	5,69	33,78	16,2	44,32	2,74
04 NI <sub>R</sub>	8,67	29,59	16,11	45,51	2,82
05 NI <sub>R</sub>	8,24	31,19	16,22	44,23	2,73
06 NI <sub>R</sub>	7,83	30,31	16,48	45,39	2,75
07 NI <sub>R</sub>	9,2	29,29	16,51	45,01	2,73
08 NI <sub>R</sub>	7,29	33,81	15,83	43,06	2,72
<b>Média</b>	<b>7,79</b>	<b>30,61</b>	<b>16,44</b>	<b>45,14</b>	<b>2,75</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,05</b>	<b>3,03</b>	<b>0,65</b>	<b>2,02</b>	<b>0,04</b>

**Fonte:** Autoria própria. (C): carbono. (O): oxigênio. (P): fósforo. (Ca): cálcio. (Ca/P): Razão cálcio/fósforo.



**Tabela 6-** Média e desvio-padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P e Ca e Ca/P no esmalte do grupo irradiado (IV<sub>T</sub>) obtida com EDX.

Amostras	C	O	P	Ca	Ca/P
A13 IV <sub>T</sub>	5,03	30,58	16,43	47,59	2,90
A14 IV <sub>T</sub>	4,77	31,31	16,7	46,81	2,80
A15 IV <sub>T</sub>	4,57	33,06	15,93	45,78	2,87
A16 IV <sub>T</sub>	4,14	32,56	16,5	46,4	2,81
A17 IV <sub>T</sub>	4,13	34,55	16,42	44,21	2,69
A19 IV <sub>T</sub>	5,31	33,03	15,85	45,34	2,86
A20 IV <sub>T</sub>	5,32	31,48	16,15	46,66	2,89
A21 IV <sub>T</sub>	4,97	31,27	16,28	46,91	2,88
A22 IV <sub>T</sub>	5,22	30,38	16,26	47,07	2,89
A23 IV <sub>T</sub>	5,44	31,06	15,96	47,06	2,95
A24 IV <sub>T</sub>	5,05	30,4	16,47	47,77	2,90
<b>Média</b>	<b>4,90</b>	<b>31,79</b>	<b>16,27</b>	<b>46,51</b>	<b>2,86</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,46</b>	<b>1,34</b>	<b>0,27</b>	<b>1,04</b>	<b>0,07</b>

**Fonte:** Autoria própria. (C): carbono. (O): oxigênio. (P): fósforo. (Ca): cálcio. (Ca/P): Razão cálcio/fósforo.

**Tabela 7-** Média e desvio-padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P e Ca e Ca/P no esmalte dos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>) obtidos com EDX.

Compostos	NI <sub>R</sub> (controle)	IV <sub>T</sub> (irradiado)	Valor de p
C	7,79 ± 1,05	4,90 ± 0,46	p<0,001*
O	30,61 ± 3,03	31,79 ± 1,34	p<0,265
P	16,44 ± 0,65	16,27 ± 0,27	p<0,443
Ca	45,14 ± 2,02	46,51 ± 1,04	p<0,069
Ca/P	2,75 ± 0,04	2,86 ± 0,07	p<0,001*

**Fonte:** Autoria própria. (C): carbono. (O): oxigênio. (P): fósforo. (Ca): cálcio. (Ca/P): Razão cálcio/fósforo.

(\*): Indica uma diferença significativa em relação ao grupo NI<sub>R</sub> (p<0,05%).

As **Tabelas 8 e 9** exibem os resultados da Espectroscopia de Dispersão de Energia-EDX para a dentina nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>), respectivamente.

Apenas o elemento carbono (C), mostrou elevação significativa (p<0,030) no grupo irradiado (IV<sub>T</sub>). Os demais elementos não sofreram alterações (**Tabela 10**).

As grandes variações observadas em ambos os grupos podem representar uma limitação do método utilizado, por ser aleatório o posicionamento da sonda para a análise composicional.

**Tabela 8-** Média e desvio padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P e Ca e Ca/P na dentina do grupo controle (NI<sub>R</sub>) obtida com EDX.

<b>Amostras</b>	<b>C</b>	<b>O</b>	<b>P</b>	<b>Ca</b>	<b>Ca/P</b>
A1NI <sub>R</sub>	17,18	29,61	14,21	38,76	2,73
A2 NI <sub>R</sub>	15,45	30,75	15,54	38,92	2,50
A3 NI <sub>R</sub>	45,72	34,58	0,95	3	3,16
A4 NI <sub>R</sub>	12,71	30,59	15,21	41,17	2,71
A5 NI <sub>R</sub>	49,02	34,8	-	1,64	0,00
A6 NI <sub>R</sub>	51,26	31,75	0,63	2,18	3,46
A7 NI <sub>R</sub>	50,84	33,74	-	1,07	0,00
A8 NI <sub>R</sub>	18,48	32,9	13,5	35,12	2,60
<b>Média</b>	<b>32,58</b>	<b>32,34</b>	<b>10,01</b>	<b>20,23</b>	<b>2,14</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>17,93</b>	<b>1,95</b>	<b>7,18</b>	<b>19,60</b>	<b>1,36</b>

**Fonte:** Autoria própria. (C): carbono. (O): oxigênio. (P): fósforo. (Ca): cálcio. (Ca/P): Razão cálcio/fósforo.

**Tabela 9-** Média e desvio-padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P e Ca e Ca/P na dentina do grupo irradiado (IV<sub>T</sub>) obtida com EDX.

<b>Amostras</b>	<b>C</b>	<b>O</b>	<b>P</b>	<b>Ca</b>	<b>Ca/P</b>
A13 IV <sub>T</sub>	54,02	33,23	2,82	7,67	2,72
A14 IV <sub>T</sub>	60,36	33,42	1,26	3,71	2,94
A15 IV <sub>T</sub>	50,21	33,79	4,1	9,97	2,43
A16 IV <sub>T</sub>	17,15	32,71	13,11	36,73	2,80
A17 IV <sub>T</sub>	57,69	32,49	2,46	6,35	2,58
A20 IV <sub>T</sub>	54,1	32,72	3,41	7,39	2,17
A21 IV <sub>T</sub>	56,15	33,88	2,38	6,43	2,70
A22 IV <sub>T</sub>	52,27	31,52	4,37	11,05	2,53
A23 IV <sub>T</sub>	50,05	32,22	3,95	10,6	2,68
A24 IV <sub>T</sub>	57,55	32,01	2,26	7,19	3,18
<b>Média</b>	<b>50,96</b>	<b>32,80</b>	<b>4,01</b>	<b>10,71</b>	<b>2,67</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>12,34</b>	<b>0,78</b>	<b>3,34</b>	<b>9,41</b>	<b>0,28</b>

**Fonte:** Autoria própria. (C): carbono. (O): oxigênio. (P): fósforo. (Ca): cálcio. (Ca/P): Razão cálcio/fósforo.

**Tabela 10-** Média e desvio-padrão da concentração por peso dos elementos C, O, P e Ca e Ca/P na dentina dos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>) obtidos com EDX.

Compostos	NI <sub>R</sub> (controle)	IV <sub>T</sub> (irradiado)	Valor de p
C	32,58± 17,93	50,96± 12,34	p<0,030*
O	32,34± 1,95	32,80± 0,78	p<0,547
P	10,01± 7,18	4,01± 3,34	p<0,100
Ca	20,23± 19,60	10,71± 9,41	p<0,236
Ca/P	2,14± 1,36	2,67± 0,28	p<0,267

**Fonte:** Autoria própria. (C): carbono. (O): oxigênio. (P): fósforo. (Ca): cálcio. (Ca/P): Razão cálcio/fósforo.

(\*): Indica uma diferença significativa em relação ao grupo NI<sub>R</sub> (p<0,05%).

#### 4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER-FTIR

A **Tabela 11** exhibe os resultados das análises dos elementos químicos por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier-FTIR no esmalte. Na comparação entre os grupos observamos uma redução significativa no grupo irradiado (IV<sub>T</sub>) da banda vibracional carbonato (CO<sub>3</sub> v2) (p<0,017), enquanto o carbonato (CO<sub>3</sub> v3) e fosfato (PO<sub>4</sub> v1v3), não mostraram alteração significativa pós irradiação.

A **Tabela 12** exhibe as razões M:M e RCC nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>) no esmalte. Observou-se uma redução significativa na razão RCC (p<0,039) no grupo irradiado (IV<sub>T</sub>). A razão M:M não exibiu alteração significativa.

**Tabela 11-** Média e desvio padrão da área integrada de cada componente químico do esmalte dentário nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>).

Compostos	Picos de interesse	NI <sub>R</sub> (controle)		IV <sub>T</sub> (irradiado)		Valor de p
		Média da área	DP	Média da área	DP	
CO <sub>3</sub> v2	870	4,11 ±	0,48858	3,73 ±	0,54192	p<0,017*
PO <sub>4</sub> v1 v3	1000	90,96 ±	5,56293	92,53 ±	4,69305	p<0,315
CO <sub>3</sub> v3	1500-1400	16,66 ±	3,57764	14,68 ±	3,20315	p<0,059
Amida I	1650	1,54 ±	0,74273	1,51 ±	0,55272	p<0,876

**Fonte:** Autoria própria. (CO<sub>3</sub>): carbonato. (PO<sub>4</sub>): fosfato. (v1, v2, v3): modos vibracionais.

(\*): Indica uma diferença significativa em relação ao grupo NI<sub>R</sub> (p<0,05%).

**Tabela 12-** Média e desvio padrão das razões M:M e RCC pela espectroscopia ART/FTIR do esmalte dentário nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>).

	NI <sub>R</sub> (controle)		IV <sub>T</sub> (irradiado)		Valor de p
	Média	DP	Média	DP	
M:M (Amida I/ PO <sub>4</sub> )	0,0167	0,00751	0,0163	0,00584	p<0,821
RCC (CO <sub>3</sub> v3/PO <sub>4</sub> )	0,1838	0,04130	0,1591	0,03591	p<0,039*

**Fonte:** Autoria própria. (CO<sub>3</sub>): carbonato. (PO<sub>4</sub>): fosfato. (M:M): razão matriz/mineral. (RCC): teor relativo de carbonato. (\*): Indica uma diferença significativa em relação ao grupo NI<sub>R</sub> (p<0,05%).

A **Tabela 13** exhibe os resultados das análises dos elementos químicos por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier-FTIR na dentina. Na comparação entre os grupos observamos redução significativa das duas bandas vibracionais do carbonato (CO<sub>3</sub> v2) (p<0,001), (CO<sub>3</sub> v3) (p<0,001) e do fosfato (PO<sub>4</sub> v1 v3) (p<0,001) no grupo irradiado (IV<sub>T</sub>), denotando redução significativa da fase inorgânica pós irradiação.

Também se observou o aumento significativo da fase orgânica com a elevação das bandas de amida I (p<0,001), amida II (p<0,001) e amida III (p<0,003) (**Tabela 13**).

A **Tabela 14** exhibe as razões M:M e C:M e amida I/amida III nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>) na dentina. Observou-se uma redução significativa das razões M:M (p<0,001) e C:M (p<0,001) no grupo irradiado (IV<sub>T</sub>). A razão amida I/amida III não demonstrou alteração significativa (p<0,536).

**Tabela 13-** Média e desvio padrão da área integrada de cada componente químico da dentina nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>).

Compostos	NI <sub>R</sub> (controle)			IV <sub>T</sub> (experimental)		valor de p
	Picos de interesse	Média da área	DP	Média da área	DP	
CO <sub>3</sub> v2	870	2,57 ±	0,59718	1,21 ±	0,31532	p<0,001*
PO <sub>4</sub> v1 v3	1000	109,76 ±	8,32121	95,22 ±	9,83023	p<0,001*
Amida III	1235	1,13 ±	0,32683	1,57 ±	0,46985	p<0,001*
CO <sub>3</sub> v3	1500-1400	13,77 ±	3,19937	11,01 ±	3,05093	p<0,001*
Amida II	1550	3,72 ±	1,78265	5,88 ±	2,04943	p<0,001*
Amida I	1650	14,29 ±	3,48975	20,11 ±	4,87189	p<0,003*

**Fonte:** Autoria própria. (CO<sub>3</sub>): carbonato. (PO<sub>4</sub>): fosfato. (v1, v2, v3): modos vibracionais. (\*): Indica uma diferença significativa em relação ao grupo NI<sub>R</sub> (p<0,05%).

**Tabela 14-** Média e desvio padrão das razões M:M, C:M e Al:AlII pela espectroscopia ART/FTIR da dentina nos grupos controle (NI<sub>R</sub>) e irradiado (IV<sub>T</sub>).

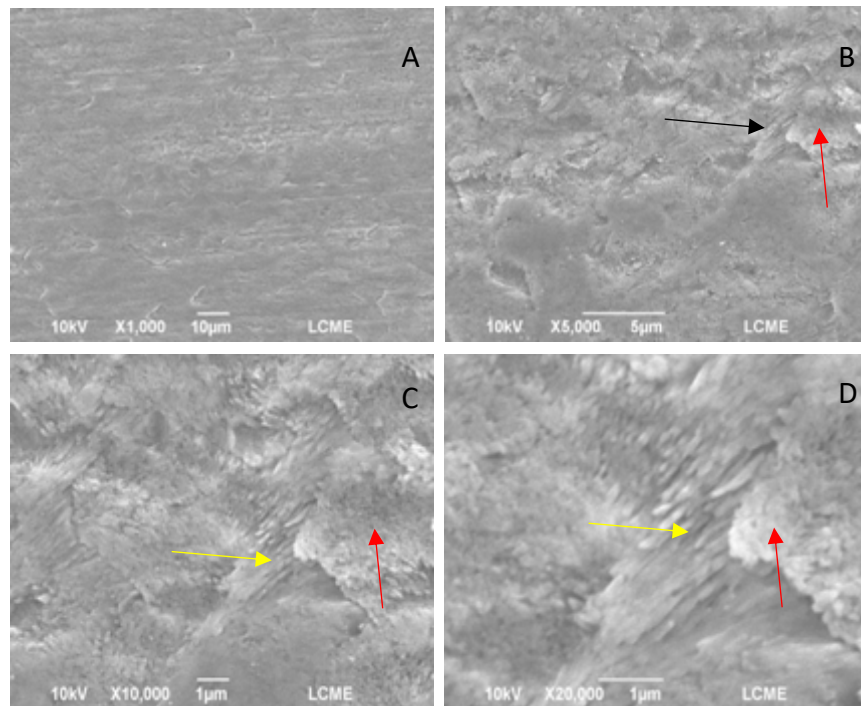
Razões	NI <sub>R</sub> (controle)		IV <sub>T</sub> (irradiado)		Valor de p
	Média	DP	Média	DP	
M:M (PO <sub>4</sub> / Amida I)	8,1516	1,60434	4,9576	0,90581	p<0,001*
C:M (CO <sub>3</sub> /PO <sub>4</sub> )	0,0232	0,00446	0,0125	0,00223	p<0,001*
Al:AlII (AMIDA I/ AMIDA III)	12,9248	1,61928	13,2739	2,18659	p<0,536

**Fonte:** Autoria própria. (CO<sub>3</sub>): carbonato. (PO<sub>4</sub>): fosfato. (M:M): razão matriz/mineral. (C:M): razão carbonato/mineral. (\*): Indica uma diferença significativa em relação ao grupo NI<sub>R</sub> (p<0,05%).

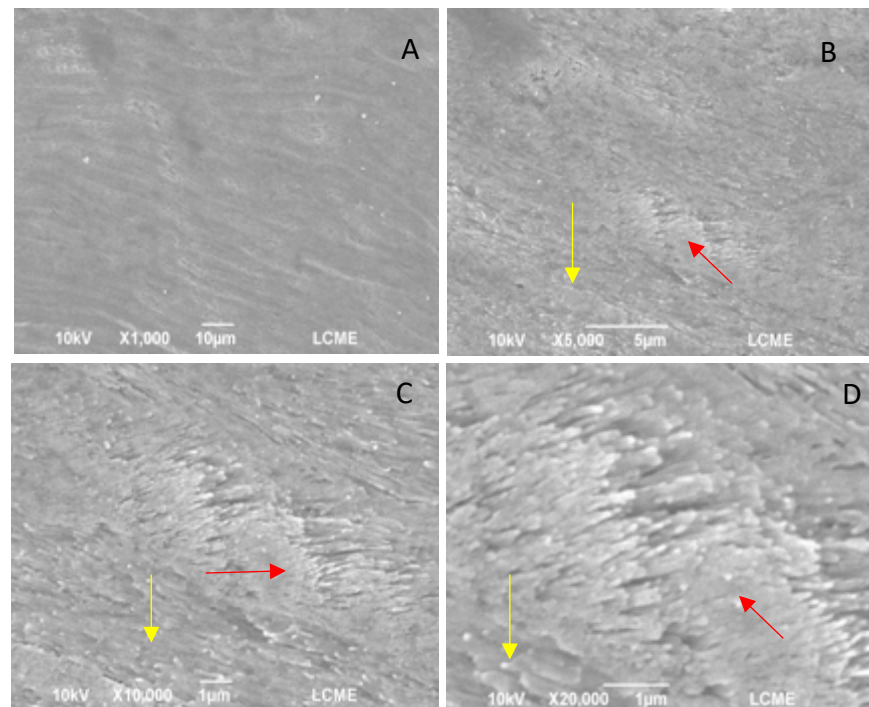
#### 4.4 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

##### 4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte - NI<sub>R</sub> (grupo controle).

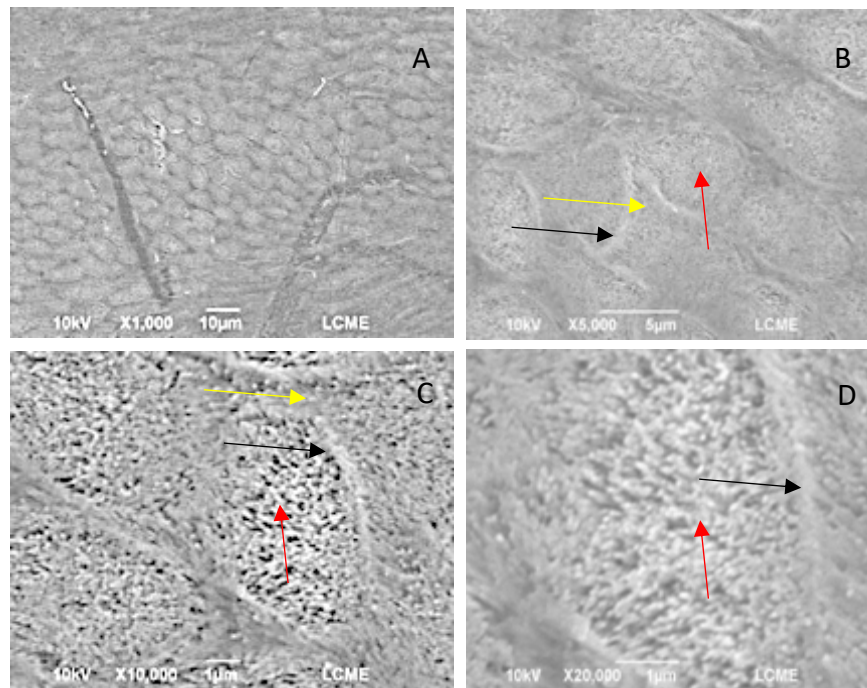
Nas **Figuras 10, 11 e 12**, observa-se morfologia condizente com características do padrão de normalidade do esmalte dentário. Com presença de áreas prismáticas e interprismáticas e cristas dispostos de forma organizada.



**Figura 10** - Microscopia Eletrônica de varredura do esmalte do grupo NI<sub>R</sub> (controle). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): área prismática. (Setas amarelas): área interprismática.



**Figura 11** - Microscopia Eletrônica de varredura do esmalte do grupo NI<sub>R</sub> (controle). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): área prismática. (Setas amarelas): área interprismática.

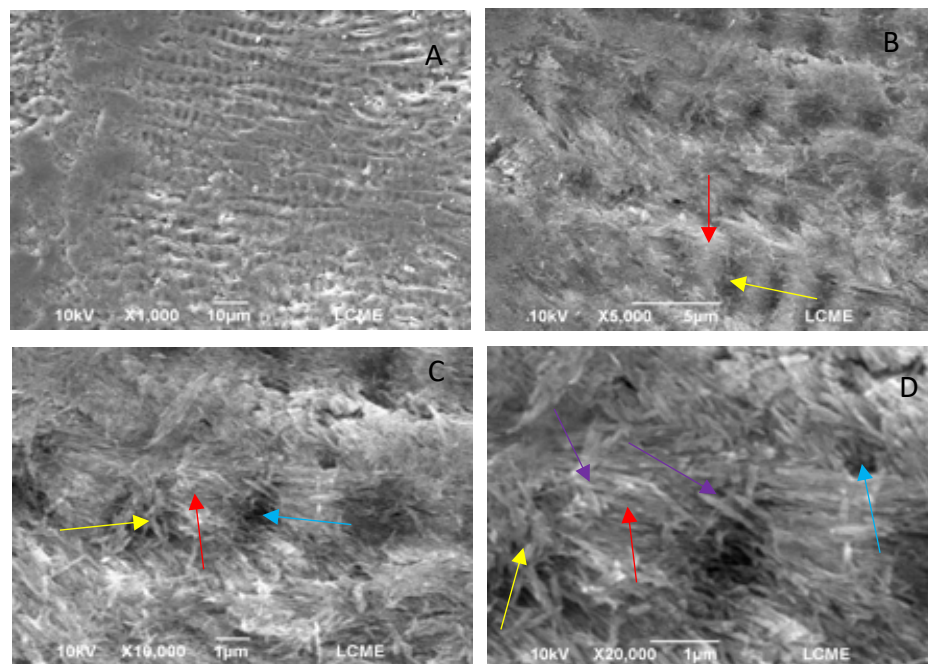


**Figura 12** - Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo NI<sub>R</sub> (controle). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): área prismática. Prisma e cristais cortados transversalmente. (Setas amarelas): área interprismática. (Setas pretas): bainha do prisma.

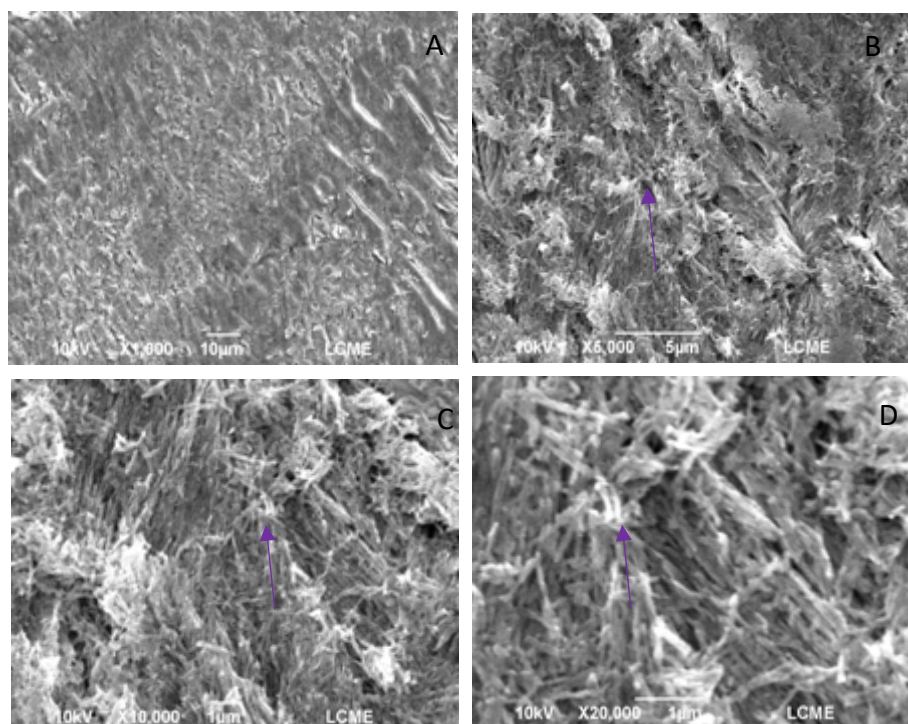
#### 4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte - IV<sub>T</sub>- (grupo irradiado)

As **Figuras 13, 14 e 15** observamos áreas apresentando alteração da morfologia superficial após irradiação com a presença de microporosidades, perda de padrões regulares das áreas prismáticas e interprismáticas, presença de desarranjo cristalino e de áreas amorfas.

Na **Figura 16** observamos que a substância interprismática pós irradiação tornou-se mais evidente em comparação com o controle.

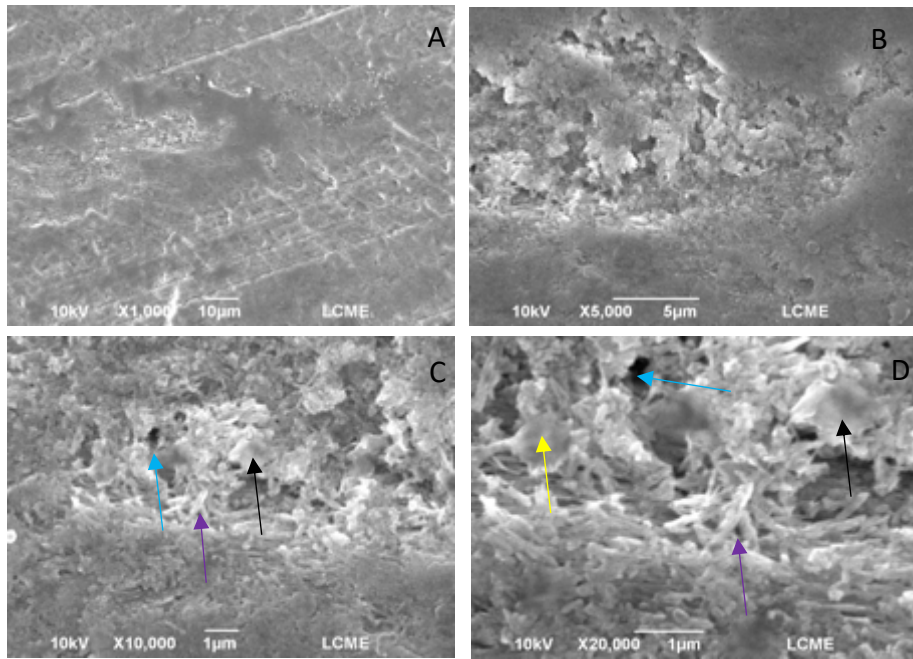


**Figura 13** - Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo IV<sub>T</sub> (irradiado). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): área prismática. (Setas amarelas): área interprismática. (Setas azuis): microporosidade. (Setas roxas): cristais desorganizados.

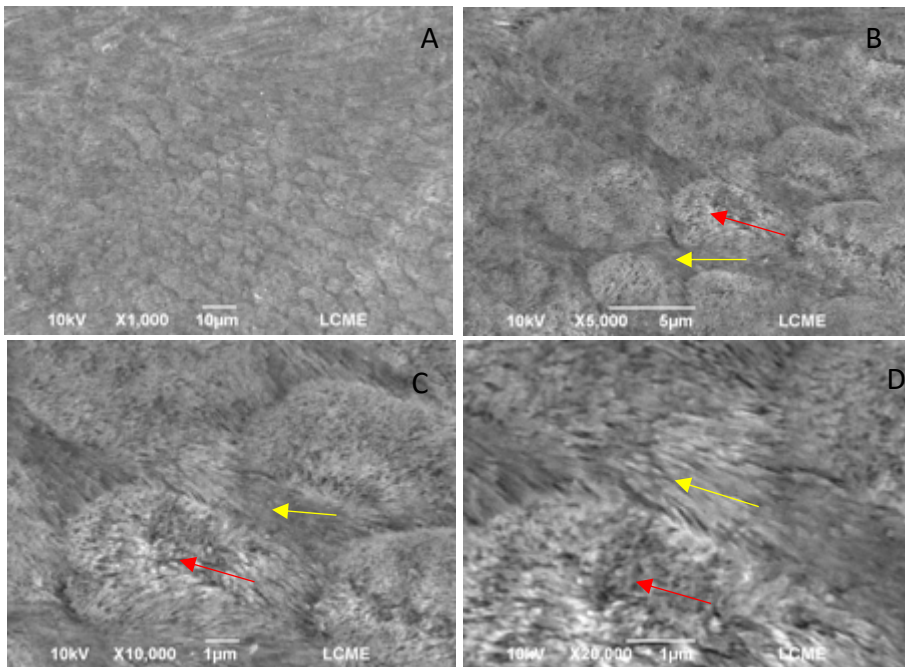


**Figura 14** - Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo IV<sub>T</sub> (irradiado). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas roxas): cristais desorganizados. Indistinação de áreas prismáticas e interprismáticas.





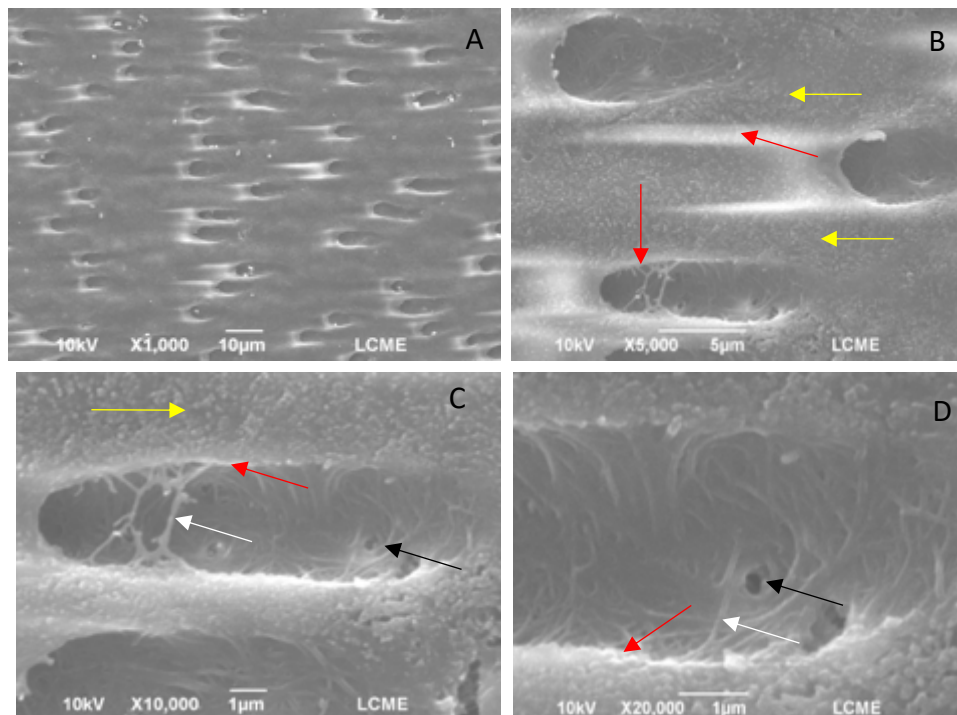
**Figura 15** - Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo IV<sub>T</sub> (experimental). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): Cristais desorganizados. (Setas azuis): microporosidades. (Setas pretas): áreas amorfas.



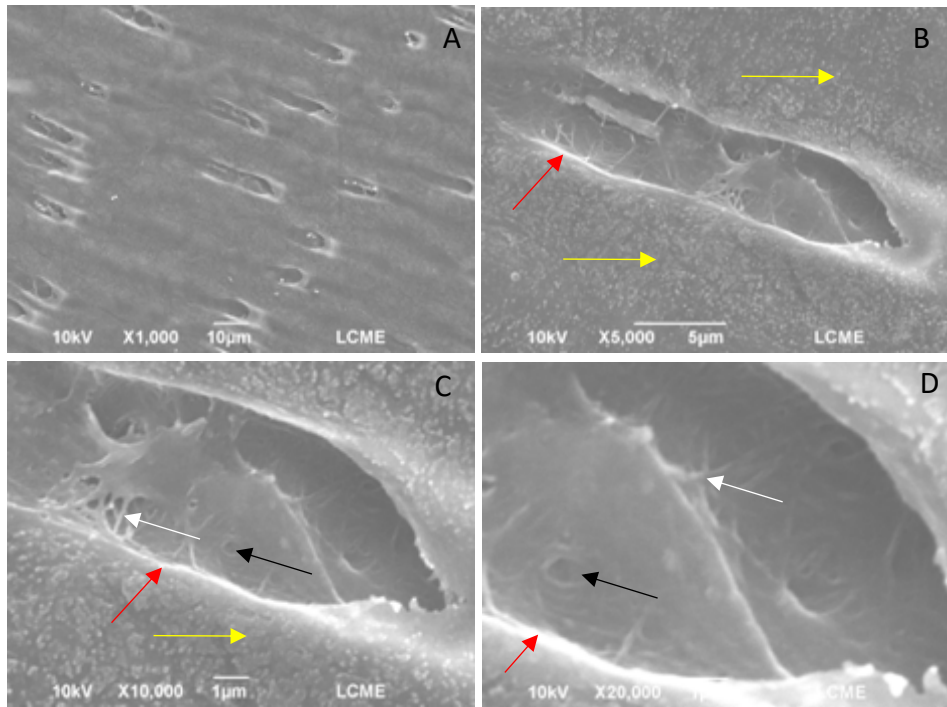
**Figura 16** - Microscopia Eletrônica de Varredura do esmalte do grupo IV<sub>T</sub> (irradiado). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): área prismática. (Setas amarelas): área interprismática.

#### 4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina- NI<sub>R</sub> (grupo controle).

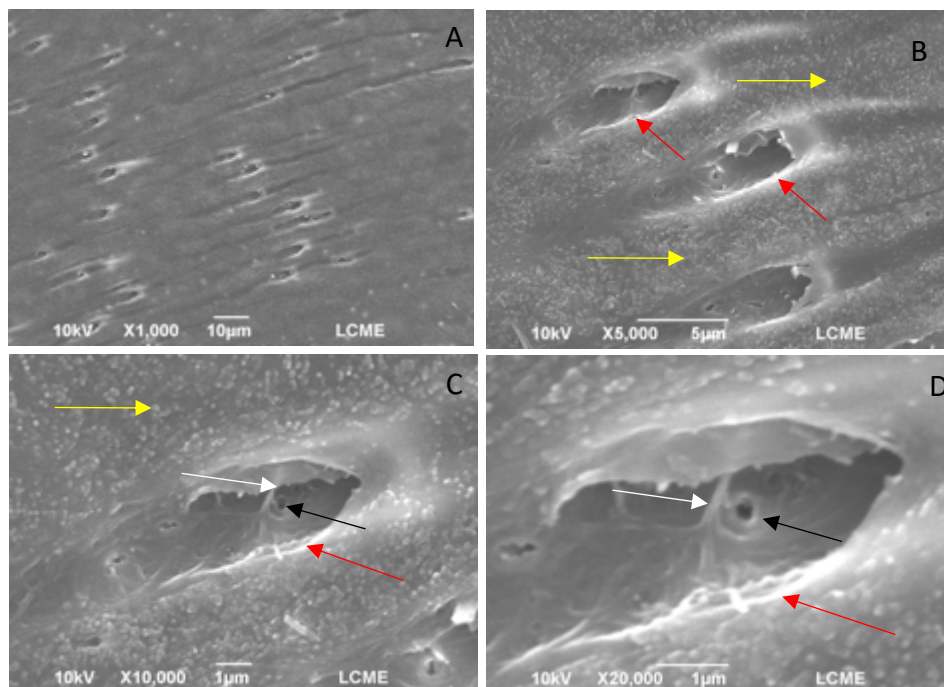
Nas **Figuras 17, 18 e 19** observamos padrões organizados de dentina peritubular e intertubular.



**Figura 17** - Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo NI<sub>R</sub> (controle). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): dentina peritubular. (Setas amarelas): dentina intertubular. (Setas pretas): ramificação colateral do túbulo. (Setas brancas): rede de fibras colágenas bem organizadas.



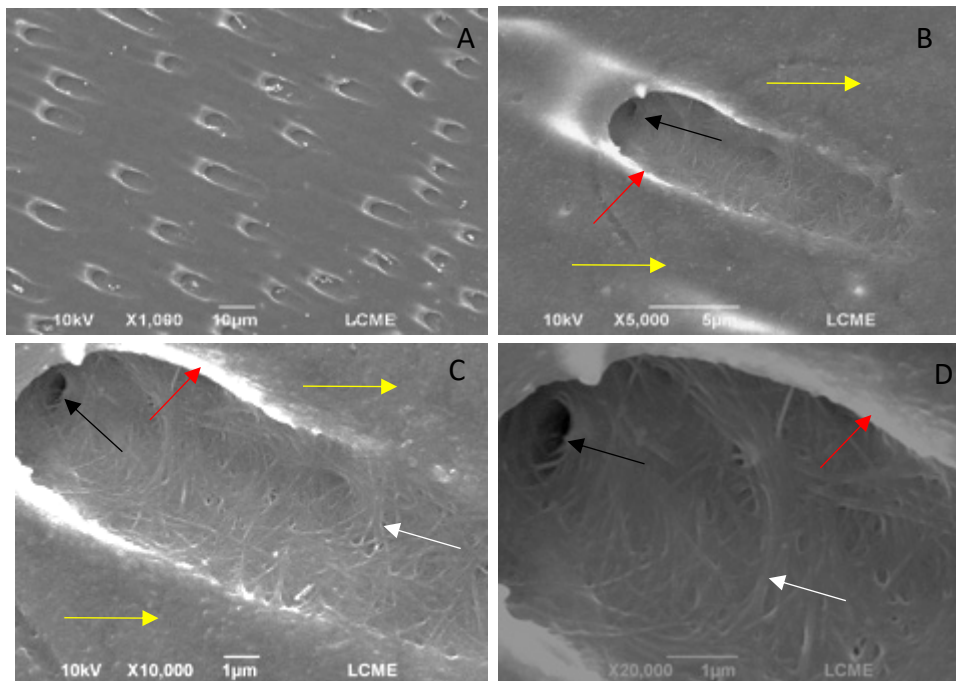
**Figura 18** - Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo NI<sub>R</sub> (controle). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): dentina peritubular. (Setas amarelas): dentina intertubular. (Setas pretas): ramificação colateral do túbulo. (Setas brancas): rede de fibras colágenas bem organizadas.



**Figura 19** - Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo NI<sub>R</sub> (controle). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): dentina peritubular. (Setas amarelas): dentina intertubular. (Setas pretas): ramificação colateral do túbulo. (Setas brancas): rede de fibras colágenas bem organizadas.

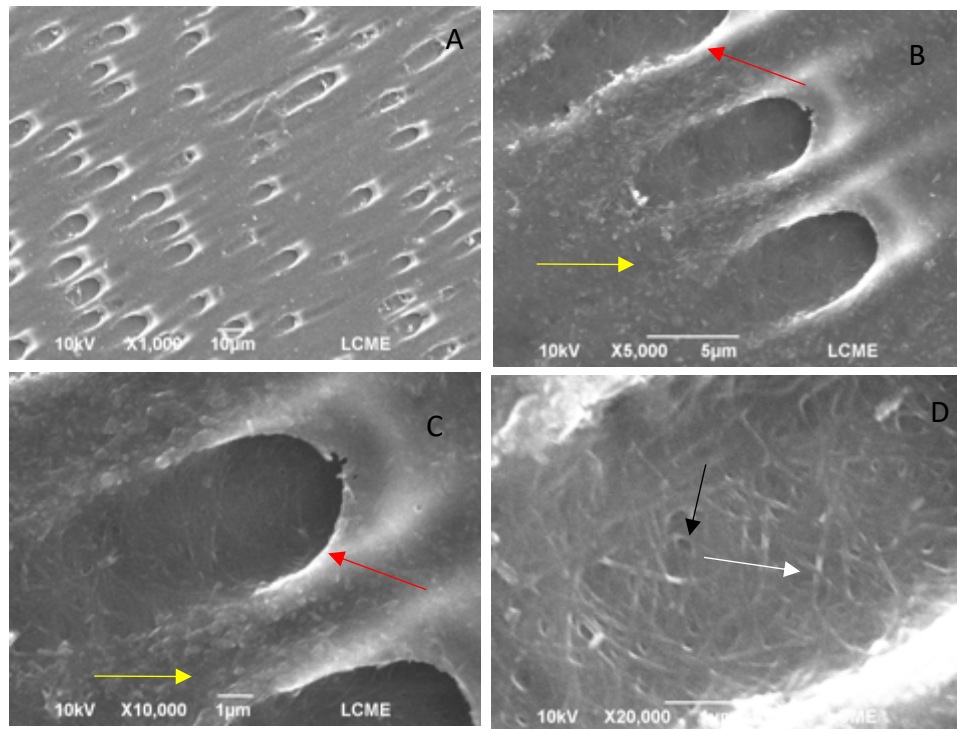
#### 4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina- IV<sub>T</sub>- (grupo irradiado)

Nas **Figuras 20, 21 e 22** mostram que após a irradiação houve manutenção do padrão de dentina peritubular e intertubular, com a presença de túbulos dentinários desobliterados e com a rede de fibras colágenas no interior dos túbulos mostrando-se mais evidentes pós irradiação.

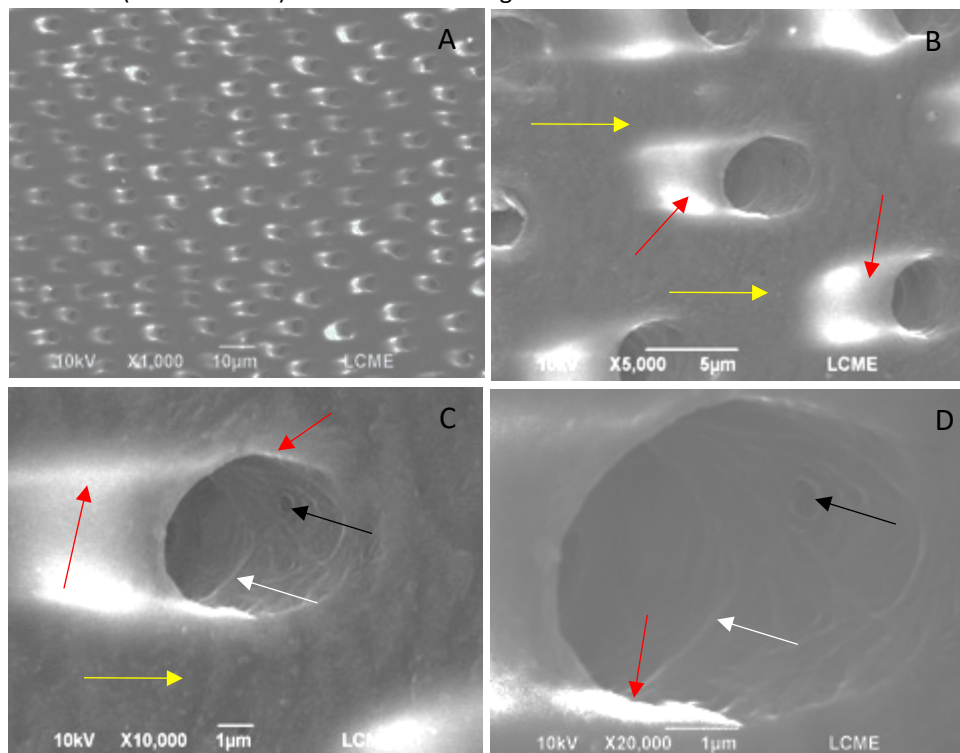


**Figura 20:** Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo IV<sub>T</sub> (irradiado). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): dentina peritubular. (Setas amarelas): dentina intertubular. (Setas pretas): ramificação colateral do túbulo. (Setas brancas): rede de fibras colágenas bem organizadas, mais evidenciadas.





**Figura 21** - Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo IV<sub>T</sub> (irradiado). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X. (Setas vermelhas): dentina peritubular. (Setas amarelas): dentina intertubular. (Setas pretas): ramificação colateral do túbulo. (Setas brancas): rede de fibras colágenas mais evidenciadas.



**Figura 22:** Microscopia Eletrônica de Varredura da dentina do grupo IV<sub>T</sub> (irradiado). (A): Magnificação de 1000X. (B): Magnificação de 5000X. (C): Magnificação de 10.000X. (D): Magnificação de 20.000X.

(Setas vermelhas): dentina peritubular. (Setas amarelas): dentina intertubular. (Setas pretas): ramificação colateral do túbulo. (Setas azuis): rede de fibras colágenas mais evidenciadas.

## 5 DISCUSSÃO

Os efeitos nocivos das radiações ionizantes sobre os tecidos dentários tem sido objeto de investigação de diversos estudos. Este interesse deve-se ao desenvolvimento da cárie de radiação como um efeito colateral pós-tratamento radioterápico (Gupta et al. 2015; Palmier et al. 2020). A radioterapia participa de uma gama de condutas terapêuticas propostas para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço (Winqvist et al. 2017; Laura, Chow 2020) e os dentes e as glândulas salivares muitas vezes são indesejavelmente alvejados por estarem no campo irradiado. Assim, a radiação pode agir produzindo efeitos diretos ao afetar as propriedades químicas, morfológicas e biomecânicas dos tecidos dentários (Gupta et al. 2015; Palmier et al. 2020), assim como através de efeitos indiretos causando danos nas glândulas salivares conduzindo a hipossalivação e xerostomia. A associação destes efeitos pode favorecer a cárie relacionada a radiação (Seyedmahmound et al. 2018; Palmier et al. 2020).

No presente estudo optou-se por um esquema simulado de doses fracionadas de radiação 2Gy/dia, 5 vezes por semana até a dose total de 70Gy (35 frações ao longo de 7 semanas) (Reed et al. 2015; Lopes et al. 2018b; Bordignon 2020; de Miranda et al. 2021). Visto que, a maioria dos cânceres de cabeça e pescoço são tratados com esquemas terapêuticos compostos por doses fracionadas que variam entre 60-70 Gy (Marur, Forastiere 2016). Durante a exposição dos dentes a radiação eles foram mantidos em água deionizada, a fim de evitar qualquer interferência sobre os tecidos dentários duros e ao mesmo tempo propiciar a radiólise da água (de Barros da Cunha et al. 2017).

É atribuída a radiação ionizante a capacidade de produzir radicais livres altamente reativos provenientes da radiólise da água, capazes de interagirem quimicamente entre si ou com moléculas em sua proximidade. Como resultado deste processo, novas moléculas podem ser danificadas, passando a disputar elétrons com o meio (Augusto Dias 2018; Hall, Giaccia 2012). Este mecanismo pode gerar alterações biomecânicas no esmalte e dentina, sendo a dentina um tecido mais sensível (Douchy et al. 2022).

No presente estudo, as propriedades mecânicas do esmalte e dentina foram analisadas através de teste de microdureza. Trata-se de um método não destrutivo capaz de investigar alterações na densidade mineral dos tecidos duros do dente. Durante um teste de microdureza observa-se a resistência a deformação plástica de uma superfície após uma indentação, realizada com um diamante sob carga e tempo pré-definidos. O resultado é a

deformação permanente do material e o comprimento da indentação é lido utilizando um microscópio. Dois tipos indentadores, Vickers (pirâmide de base quadrada) e Knoop (pirâmide de base losango) são utilizados na maioria dos estudos (Craig, Peyton 1958).

Para analisar a composição química dos tecidos dentários duros utilizamos a espectroscopia no infravermelho de transformada de Fourier (FTIR), técnica espectroscópica vibracional que se destina a análise química em amostras biomédicas, uma vez que, as frequências de vários modos vibracionais de moléculas orgânicas e inorgânicas são ativas no infravermelho (IR). Na análise FTIR, a absorção da radiação IR ocorre quando um fóton é transferido para uma molécula e a excita para um estado de energia mais alto (Chen et al. 2015; Augusto Dias 2018; Lopes et al. 2018a; de Miranda et al. 2019). Os estados excitados resultam nas vibrações das ligações moleculares (alongamento, torção, tesoura, balanço e rotação) ocorrendo em vários comprimentos de onda (ou frequências) na região IR do espectro de luz. As absorbâncias das vibrações moleculares são proporcionais à abundância dos grupos funcionais. O comprimento de onda de cada pico de absorvância do infravermelho é determinado pelas propriedades físico-químicas das moléculas, funcionando como uma espécie de impressão digital de um grupo funcional específico (C-H, O-H, C=O) (Chen et al. 2015; Lopes et al. 2018a; de Miranda et al. 2019).

A absorbância de cada banda vibracional é frequentemente medida pela altura máxima ou pela área integrada entre o pico e uma linha de base. A linha de base mais utilizada é um traço linear que tangencia os pontos mínimos de cada lado do pico (Chen et al. 2015).

O ATR (Reflexão Total Atenuada) é uma forma de espectroscopia de reflexão interna. Neste método, a amostra é colocada em contato com um elemento de reflexão interna (IRE) com alto índice de refração, comumente, um cristal de diamante. Uma reflexão interna completa ocorre na interface amostra-cristal e a radiação infravermelha é direcionada para um detector (Augusto Dias 2018; Lopes et al. 2018a).

FTIR/ATR tem pouca profundidade de penetração, neste sentido, mensura uma fina camada da amostra que está em contato com o cristal (Augusto Dias 2018; Lopes et al. 2018a; de Miranda et al. 2019). Além disso, como a luz infravermelha é transmitida através da amostra, pouca ou nenhuma preparação é necessária, sendo considerado um método não destrutivo (Lopes et al. 2018a).

Tanto o esmalte quanto a dentina são compostos por uma fase inorgânica e uma mineral. A fase mineral é representada pelos picos espectrais de carbonato e fosfato. A fase



orgânica do esmalte pós-eruptivo é pequena, comumente representada pela amida I. A fase orgânica da dentina é abrangente e composta principalmente de colágeno tipo I que se apresenta como bandas espectrais de amida I, amida II, amida III (Lopes et al. 2018a).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi utilizada na análise microestrutural, trata-se de um método amplamente utilizado na caracterização de biomateriais, com ampliações de 10x a mais de 300.000x. Pode ser combinada com a microanálise química da superfície da amostra por EDX do inglês Energy Dispersive x-Ray Detector- EDX. Este método fornece análise química semiquantitativa da amostra. Baseia-se na radiação de amostras com elétrons de alta energia e na observação de raios X emitidos resultantes da desexcitação da vacância de elétrons no núcleo. As energias de raios X emitidas geralmente serão diferentes de elemento para elemento, considerando que cada elemento possui uma estrutura atômica única (Mitić et al. 2017).

Em relação as propriedades mecânicas do esmalte observamos uma redução significativa da microdureza após irradiação. Estes achados são concordantes com estudos prévios *in vitro* após doses fracionadas de radiação 1,95-2Gy/dia variando entre 60 e 70 Gy (Hegde et al. 2015; Quing et al. 2015; Lopes et al. 2018b; Wu et al. 2020; de Miranda et al. 2021; Dur, Celik, Seven 2022). Muñoz et al. (2020) observaram redução em dose única de 20, 40 e 70 Gy e Kudkuli et al. (2020) em dose única de 80 Gy.

Estudos que levaram em consideração a profundidade do esmalte, analisando microdureza no esmalte superficial, médio e profundo comparando as diferentes profundidades, observaram variações. Lu et al. (2019) observaram decréscimo significativo a partir de 30Gy apenas no esmalte profundo. Seyedmahmound et al. (2018), observaram decréscimo apenas no esmalte médio e superficial *in vivo* e *in vitro*. Gonçalves et al. (2014) não observaram alterações no esmalte nestas profundidades, enquanto Duruk et al. (2020) observaram decréscimo nos 3 terços a partir de 60 Gy.

A análise da composição química por FTIR demonstrou que em relação a matriz orgânica do esmalte representado pela banda amida I observamos que que não houve alteração significativa pós irradiação, assim como no estudo de Lopes et al. (2018b) (70 Gy 2Gy/dia) e Muñoz et al. (2020) (dose única de 70Gy), porém divergindo dos resultados de estudo prévio que observou redução da amida I após a dose de 50Gy (2Gy/dia) (de Miranda et al. 2021).

Ao analisar os componentes inorgânicos da matriz do esmalte observamos que não houve alteração significativa do fosfato v1 v3 após irradiação (70 Gy, 2 Gy/dia) corroborando com Lopes et al. (2018b). Paredes et al. (2017) também não observaram alteração utilizando doses fracionadas de 4 Gy/dia até alcançar 72 Gy. No entanto, nossos resultados são discordantes do estudo de Miranda et al. (2021) que observou redução deste composto após a dose de 70Gy (2 Gy/dia) e Qing et al. (2015) após 60 Gy (2 Gy/dia).

Detectamos um decréscimo significativo do teor de carbonato v2, assim como demonstrado por Qing et al. (2015) com a dose de 60Gy 2Gy/dia. Em relação ao carbonato v3, não observamos alteração significativa, concordando com achados de estudos anteriores que não observaram variações pós irradiação (Lopes et al. 2018b; de Miranda et al. 2021).

Dentre as razões analisadas no esmalte observamos que não houve alteração da razão M:M (amida I/fosfato) no grupo irradiado, que mede a quantidade de matriz orgânica no volume analisado, em relação a matriz inorgânica (Lopes et al. 2018a). Este achado corrobora com Lopes et al. (2018b), mas discorda de um estudo anterior que demonstrou um decréscimo destas razões (de Miranda et al. 2021).

A RCC (relação carbonato/fosfato) no esmalte, mede a proporção de carbonato para fosfato indicando a incorporação de carbonato na rede de hidroxiapatita (Lopes et al. 2018a). Neste sentido, observamos uma redução significativa no grupo irradiado assim como observado por Muñoz et al. (2020) que utilizou uma dose única de 70 Gy. Hegde et al. (2019) e Qing et al. (2015) observaram um aumento desta razão, com doses fracionadas, o primeiro com 70 Gy (7 Gy/dia) e o segundo 60 Gy (2 Gy/dia). Já de Miranda et al. (2021) e Lopes et al. (2018b) não observaram alteração ao comparar o controle com o grupo irradiado em doses fracionadas de 2Gy/dia até alcançar 70 Gy.

Nas análises de EDX não observamos variação no conteúdo de cálcio e fósforo após radiação, corroborando com estudo prévio (de Miranda et al. 2021), mas a razão Ca/P mostrou-se significativamente mais elevada no grupo irradiado, discordando dos achados de estudos anteriores que não observaram mudanças (de Barros da Cunha et al., 2017; Kudkuli et al. 2019; de Miranda et al. 2021). Dur, Celik, Seven (2022) detectaram redução após irradiação. Foi observada a redução significativa do elemento carbono, discordando de estudo anterior (de Miranda et al. 2021).

Na análise morfológica do esmalte através de MEV observamos na maioria dos fragmentos áreas apresentando alteração da morfologia superficial após radiação com a

presença de microporosidades, perda de padrões regulares das áreas prismáticas e interprismáticas, em concordância com achados anteriores (Paredes et al. 2017; Hegde et al. 2019; Lu et al. 2019; Kudkuli et al. 2020; Wu et al. 2020) e presença de áreas amorfas assim como demonstrado em estudos prévios (Hegde et al. 2019; Demirkan et al. 2020; Duruk et al. 2020). Nas amostras onde houve preservação do padrão prismático e interprismático observamos que a substância interprismática pós irradiação tornou-se mais evidente em comparação com o controle, corroborando com Madrid et al. (2017) e Gonçalves et al. (2014). Nossos resultados discordam de Lopes et al. (2018b) que não observaram alterações morfológicas no esmalte irradiado.

O conteúdo mineral do esmalte é descrito como uma hidroxiapatita carbonatada  $[Ca_{10-x} Na_x (PO_4)_{6-y} (CO_3)(OH)_{2-u} F_u]$  organizado na forma de cristais densamente compactados e organizados representando 96% de seu peso. O espaço entre os cristais é ocupado por água e matéria orgânica (Shellis, Featherstone, Lussi 2014; Nanci 2018b). A apatita do esmalte pode ter diferentes substitutos para  $Ca^{2+}$  como  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  e para fosfato e hidroxila como  $CO_3^{2-}$ ,  $F^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$  e  $H_2O$ . As diferentes substituições são dependentes do meio (Bachmann, Craievich, Zezell 2004; Duverger, Beniash, Morasso 2016; Nanci 2018b). No esmalte formado, carbonato representa 3,2% de seu peso seco, e apresenta maior solubilidade (Shellis, Featherstone, Lussi 2014). Nos nossos resultados observamos uma redução significativa do carbonato v2, sem que houvesse alteração do carbonato v3, fosfato e amida I. Isso refletiu na manutenção da razão M:M pela inalteração do fosfato e amida I e redução do RCC pós irradiação, uma vez que, o carbonato v3 mostrou uma tendência em direção a significância. A redução de uma das bandas de carbonato pode estar relacionada a sua substituição por íons hidroxila na rede cristalina. A análise em EDX demonstrou manutenção do teor de cálcio e fósforo, mas um aumento da razão Ca/P pós irradiação. Esses eventos podem estar relacionados a radiólise da água, visto que, radicais livres resultantes da ionização das moléculas de água ( $H^+$  e  $OH^-$ ) podem interagir com a estrutura cristalina e favorecer substituições (Hall, Giaccia 2012; Munõz et al. 2020). Ao comparar os resultados obtidos com FTIR e EDX observamos uma convergência entre os achados, com redução do carbonato e inalteração do fosfato (FTIR) e redução do carbono e manutenção do fósforo (EDX).

A matriz orgânica do esmalte parece ser menos afetada pela radiação ionizante quando comparada a dentina e tecido ósseo (Paredes et al. 2017; Muñoz et al. 2020; Douchy et al. 2022). É possível que isto esteja associado ao baixo teor orgânico deste tecido

(Bachmann, Craievich, Zezell 2004; Duverger, Beniash, Morasso 2016). Consequentemente, a expressão das bandas da matriz orgânica é fraca em comparação com as bandas minerais (Lopes et al. 2018) limitando sua análise (Douchy et al. 2022).

No esmalte, não podemos inferir uma influencia direta entre alterações do conteúdo mineral e redução de microdureza. Neste sentido, Douchy et al. (2022) concluíram após uma revisão sistemática de literatura sobre os efeitos da radiação terapêutica sobre o esmalte e dentina, que o decréscimo dos valores de microdureza pós irradiação na maioria dos estudos analisados, não apresenta correlação com a composição química verificada por espectroscopia vibracional e EDX, provavelmente porque microdureza avalia alterações na densidade mineral, enquanto EDX é um método para análise química superficial semi-quantitativa (Lopes et al. 2018) e FTIR fornece informação sobre a estrutura molecular de componentes orgânicos e inorgânicos caracterizando-os quimicamente (Chen et al. 2015).

Para investigar a variação de conteúdo mineral comparando-o com microdureza, a literatura aponta que microrradiografia quantitativa, seria o padrão ouro, por apresentarem uma relação linear entre si (Featherstone et al. 1983; Douchy et al. 2022). Embora não avaliado em nossa pesquisa, vários estudos onde houve decréscimo da microdureza também observaram decréscimo do índice de cristalinidade (Qing et al. 2015; Hedge et al. 2019; Muñoz et al. 2020), sugerindo que a redução do índice de cristalinidade pode estar associada a redução as propriedades mecânicas.

Observamos uma concordância entre as alterações morfológicas e redução da microdureza no esmalte, isto pode estar relacionado ao desarranjo cristalino e a presença de áreas amorfas afetando as propriedades mecânicas deste tecido. Alguns autores têm relacionado a redução da microdureza do esmalte com a descarboxilação como resultado da radiação (Hegde et al. 2015; Liang et al. 2016; Seyedmahmoud et al. 2018). Este fenômeno está embasado nos resultados de Hubner et al. (2005) que sugere que a descarboxilação dos grupos laterais carboxilato no colágeno na superfície óssea pós-radioterapia levaria à diminuição das propriedades mecânicas e ao aumento da rugosidade da superfície. Acredita-se que a interação entre a matriz orgânica e os cristais de apatita seja de natureza eletrostática envolvendo grupos carboxilato da cadeia lateral da proteína e grupos fosfato de apatita através de pontes de íons de cálcio. Após a irradiação, as interações da matriz orgânica-mineral seriam diminuídas, com liberação concomitante de dióxido de carbono, capaz de provocar microfissuras nos cristais de apatita, resultando na superfície rugosa (Hubner et al.

2005). Devido às composições semelhantes de apatita carbonatada e proteínas, essa hipótese foi estendida às estruturas do esmalte dentário (Douchy et al. 2022).

A redução da microdureza, desarranjo cristalino, presença de áreas amorfas pode contribuir para a fragilidade do esmalte dentário, favorecer a delaminação e aumentar sua suscetibilidade a cárie de radiação, especialmente em um meio onde haja redução do fluxo salivar, dieta cariogênica e higiene bucal deficiente, condições comumente presentes durante o tratamento do câncer de cabeça e pescoço.

Em relação as propriedades mecânicas da dentina observamos uma redução significativa da microdureza após irradiação. Estes achados corroboram com estudos prévios *in vitro* após doses fracionadas de radiação 1,95-2 Gy/dia variando entre 60 e 70 Gy (Hedge et al. 2015; Wu et al. 2019). Gonçalves et al. (2014) observaram significativo decréscimo a partir de 10 Gy nos terços médio e superficial da dentina e Muñoz et al. (2020) observaram redução da microdureza na dose única total de 20, 40 e 70 Gy. Duruk et al (2020) não observaram alteração utilizando 2 Gy/dia até alcançar 60 Gy e Rodrigues et al. (2018) observaram elevação da microdureza após radiação.

Na análise dos componentes da matriz inorgânica da dentina representados pelas bandas de  $PO_4$  v1 v3 e  $CO_3$  v2 e v3, analisados por FTIR, observamos uma redução significativa destes componentes. Por outro lado, a matriz orgânica, representada pelas bandas das amidas I, II e III demonstrou aumento significativo após irradiação. Esses resultados impactaram nas razões, visto que, a razão M:M (fosfato/amida I) (mensura a quantidade de matriz orgânica no volume analisado) reduziu de forma significativa no grupo irradiado corroborando com os achados de estudo prévio que analisou amostras de dentina coronária irradiadas *in vivo* (1.8 Gy/dia até o total de 72 Gy) (de Miranda et al. 2019).

Para a relação C:M (carbonato/fosfato) que indica a extensão da incorporação de carbonato dentro do cristal de hidroxiapatita, observamos diminuição significativa após irradiação corroborando com achado de estudo anterior com doses únicas de 40 e 70 Gy (Muñoz et al. 2020), mas divergindo dos resultados de estudo prévio que não observou alteração desta razão (de Miranda et al. 2019).

Tratando-se da razão amida I/amida III não detectamos alteração significativa desta razão, enquanto em estudo anterior observaram significativo decréscimo (de Miranda et al. 2019).

Na dentina, nas análises de EDX demonstraram que não houve alteração significativa do teor de cálcio e fósforo, assim como da razão Ca/P após radiação. Observamos um elevado desvio padrão denotando uma limitação do método, por ser aleatório o posicionamento da sonda para a análise composicional e as variações do conteúdo orgânico e inorgânico pode dificultar a leitura.

A análise micromorfológica através de MEV demonstrou que após a irradiação houve manutenção do padrão de dentina peritubular e intertubular, com a presença de túbulos dentinários desobliterados. A rede de fibras colágenas no interior dos túbulos mostrou-se mais evidente no grupo irradiado. Não observamos obliteração dos túbulos dentinários, nem a presença de estrutura amorfa, rachaduras e fissuras como observado em outros estudos (Gonçalves et al. 2014; Rodrigues et al. 2018; Demirkan et al. 2020; Duruk et al. 2020).

Nossos resultados sugerem que as alterações sofridas pela dentina após irradiação estejam relacionadas a sua composição. Sabe-se que este tecido apresenta elevado conteúdo orgânico e de água. A matriz orgânica da dentina é formada principalmente de colágeno tipo I (Paschalis et al. 2001; Slimani et al. 2017; Nanci 2018a). Uma característica singular do colágeno presente na matriz orgânica da dentina é sua organização na forma de fibras, fibrilas e microfibrilas. Estas últimas dispostas pelo escalonamento das moléculas de colágeno, com áreas de “gaps” e de sobreposição, ligadas entre si através de ligações cruzadas covalentes, resultado da interação entre grupos aldeídos e grupos amino livres. Este arranjo confere às matrizes fibrilares propriedades mecânicas como resistência à tração e viscoelasticidade (Knott, Bailey 1998; Paschalis et al. 2001; Slimani et al. 2017; Lopes et al. 2018a; Nanci 2018a; Rodrigues et al. 2019). As bandas vibracionais das amidas I, II e III representam a matriz orgânica na dentina (Lopes et al 2018a). A amida I é a principal banda de absorção na proteína e é governada principalmente pelas vibrações de estiramento do C=O (70-85%) e C-N (10-20 %) (Rodrigues et al. 2018; Lopes et al. 2018a; de Miranda et al. 2019).

Nosso estudo demonstrou que a fase orgânica e inorgânica da dentina sofreu alterações após irradiação evidenciada pelo aumento das bandas de amida I, II e III, redução dos componentes fosfato e carbonato e diminuição das razões M:M e C:M.

É possível que essas mudanças estejam relacionadas radiólise da água provocada pela irradiação levando a produção de radicais livres, altamente reativos, como oxigênio e peróxido de hidrogênio, que interagem com as moléculas do meio, podendo provocar danos, ao alterar

propriedades físicas e químicas, ou seja, produzir um efeito biológico (Hall, Giaccia 2012; Douchy et al. 2022; Noouailhetas 2022).

Neste sentido, terminais N (2 resíduos de lisina ou hidroxilisina) e C (2 resíduos de lisina ou hidroxilisina) envolvidos na iniciação das ligações da cadeia tropo-colágeno (Yamauchi, Sricholpech 2012), podem interagir com radicais livres provenientes da radiólise da água (Hall, Giaccia 2012) e elevar as bandas das amidas I, II e III denotando um rearranjo molecular do colágeno, causando mudanças consideráveis na sua integridade estrutural, conduzindo a uma reorganização dos componentes químicos (Cheung et al. 1990; Rodrigues et al. 2018; de Miranda et al. 2019) e resultando em outro tipo de colágeno (de Miranda et al. 2019), o que por consequência, pode afetar as propriedades mecânicas da dentina.

Assim como no esmalte, é provável que o fenômeno da descarboxilação dos grupos laterais carboxilato no colágeno decorrentes da irradiação possa contribuir para à diminuição das propriedades mecânicas, pela redução das interações da matriz orgânica-mineral, uma vez que, esta interação ocorre através de ligações eletrostáticas entre grupos carboxilato do colágeno e grupos fosfato da apatita através de pontes de íons de cálcio (Hubner et al. 2005).

Ambos os fenômenos, a quebra das ligações cruzadas e a descarboxilação, poderiam contribuir para a redução da microdureza na dentina, à medida que modifica a estrutura molecular do tecido dentinário. É possível que as alterações induzidas pela radiação na estrutura do colágeno possam impactar a estabilidade da junção amelo-dentinária, levando à delaminação do esmalte que ocorre após o tratamento (Reed et al. 2015).

Somando-se as alterações na fase orgânica, também observamos alterações da fase mineral da dentina com a redução dos componentes carbonato e fosfato. A dentina é composta por aproximadamente 70% de material inorgânico, representado principalmente por uma hidroxiapatita carbonatada ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-y}(\text{CO}_3)_{x+y}$ , ( $0 \leq X \leq 6$ ,  $0 \leq Y \leq 2$ ) na forma de pequenos cristais. As fibras de colágeno são reforçadas pela mineralização de cristais de fosfato de cálcio que ocorre dentro das fibras de colágeno e entre as fibras (Nanci 2018a; Slimani et al. 2017).

Os minerais intrafibrilares que enrijecem as fibrilas de colágeno são responsáveis pelo comportamento elástico da dentina. A irradiação de raios X de alta energia pode destruir os minerais intrafibrilares (Liang et al. 2016), influenciar na troca de íons fosfato e carbonato (de Miranda et al. 2019) através da radiólise da água e produção de radicais livres e desta forma, contribuir para a redução da microdureza na dentina e alterações micromorfológicas. A

associação entre a redução da fase mineral e o aumento da fase orgânica pode repercutir na micromorfologia, demonstrada pela evidenciação da rede de fibras colágenas no interior dos túbulos dentinários observados no grupo irradiado, fenômeno este, possivelmente decorrente da redução do teor mineral e aumento do teor orgânico.

A cárie relacionada a radiação é uma condição multifatorial. As alterações sofridas pelas fases orgânicas e inorgânicas do esmalte e dentina pós irradiação como um efeito direto da radiação somadas aos efeitos indiretos como hipossalivação e xerostomia, aumentam a vulnerabilidade destes tecidos a cárie relacionada a radiação.

Compreendemos que este estudo tem limitações por se tratar de um estudo *in vitro* incapaz de transpor completamente as condições singulares do meio bucal do paciente submetido a radioterapia. A metodologia empregada, embora consolidada pela literatura é incapaz de abranger todas as facetas das possíveis alterações sofridas pelos tecidos dentários.

Neste sentido, novos estudos sobre como prevenir, reduzir ou eliminar os efeitos diretos da radiação sobre os tecidos dentários duros, assim como gerenciar os impactos dos efeitos indiretos são relevantes para o manejo e qualidade de vida do paciente com câncer de cabeça e pescoço submetidos a radioterapia.



## 6 CONCLUSÃO

- Doses terapêuticas de radiação ionizante provocaram alterações morfológicas no esmalte e na dentina.
- A radiação ionizante sobre o esmalte reduziu de forma significativa a concentração do elemento carbono (C) e elevou a razão Ca/P, sem alterar a concentração dos elementos oxigênio (O), cálcio (Ca) e fósforo (P).
- A microdureza do esmalte e da dentina sofreu redução significativa após irradiação demonstrando redução das propriedades mecânicas destes tecidos.
- Doses terapêuticas de radiação ionizante não provocaram mudanças na constituição proteica do esmalte, mantendo valores similares da banda vibracional amida I antes e após irradiação.
- A constituição mineral do esmalte sob efeito da radioterapia mostrou redução da banda de carbonato ( $\text{CO}_3 \nu_2$ ) sem exibir alteração expressiva do carbonato ( $\text{CO}_3 \nu_3$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4 \nu_1 \nu_3$ ).
- Na dentina, a constituição proteica e mineral mostrou após doses terapêuticas de radiação, aumento das bandas de amida I, II e III e redução das bandas vibracionais dos carbonatos ( $\text{CO}_3 \nu_2$ ) e ( $\text{CO}_3 \nu_3$ ) e do fosfato ( $\text{PO}_4 \nu_1 \nu_3$ ).

Desta forma, inferimos que a doses terapêuticas de radiação exercem um impacto negativo sobre as propriedades mecânicas, químicas e morfológicas dos tecidos dentários duros e podem contribuir para o risco e progressão da cárie relacionada a radiação.

Assim, reforçamos a importância da entrega de doses terapêuticas de radioterapia de forma mais assertiva no alvo desejado, reduzindo o impacto nos tecidos adjacentes ao tumor. Além disso, destacamos a necessidade de um acompanhamento clínico odontológico antes, durante e após radioterapia com a finalidade de gerenciar as possíveis complicações orais oriundas das terapias antineoplásicas, contribuindo para a melhora na qualidade de vida dos pacientes submetidos ao tratamento do câncer de cabeça e pescoço.

## 7 REFERÊNCIAS

Arola DD, Gao S, Zhang H, Masri R. The tooth: Its structure and properties. Dent Clin North Am. 2017 Oct;61(4):651-668.

Augusto Dias D. Estudo *in vitro* dos efeitos da radiação ionizante em tecido ósseo por espectroscopia vibracional. [dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2018. Disponível em: [www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br). [2022 29 jul].

Bachmann L, Craievich AF, Zezell DM. Crystalline structure of dental enamel after Ho:YLF laser irradiation. Arch Oral Biol. 2004 Nov;49(11):923-9.

Bordignon NCT. Efeitos da radioterapia na resistência de união à microtração de sistemas restauradores adesivos. [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2020.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. INCA. Estimativa 2020: Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. [2022 10 jul].

Chen Y, Zou C, Mastalerz M, Hu S, Gasaway C, Tao X. Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences- A Review. Int J Mol Sci. 2015 Dec 18;16(12):30223-50.

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 May;24(5):581-9.

Craig RG; Peyton FA. The micro-hardness of enamel and dentin. *J Dent Res.* 1958 Aug; 37(4):661-8.

de Barros da Cunha SR, Fonseca FP, Ramos PAMM, Haddad CMK, Fregnani ER, Aranha ACC. Effects of different radiation doses on the microhardness, superficial morphology, and mineral components of human enamel. *Arch Oral Biol.* 2017 Aug;80:130-135.

Demirkan I, Yaprak G, Ceylan C, Algul E, Tomruk CO, Bilen B et al. Acoustic diagnosis of elastic properties of human tooth by 320 MHz scanning acoustic microscopy after radiotherapy treatment for head and neck cancer. *Radiat Oncol.* 2020 Feb 17;15(1):38.

de Miranda RR, Silva ACA, Dantas NO, Soares CJ, Novais VR. Chemical analysis of in vivo-irradiated dentine of head and neck cancer patients by ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Clin Oral Investig.* 2019 Aug;23(8):3351-3358.

de Miranda RR, Ribeiro TE, Silva ELCD, Simamoto Júnior PC, Soares CJ, Novais VR. Effects of fractionation and ionizing radiation dose on the chemical composition and microhardness of enamel. *Arch Oral Biol.* 2021 Jan; 121:104959.

Douchy L, Gauthier R, Abouelleil-Sayed H, Colon P, Grosgeat B, Bosco J. The effect of therapeutic radiation on dental enamel and dentin: A systematic review. *Dent Mater.* 2022 Jul;38(7):e181-e201.

Dur MP, Celik N, Seven N. Evaluation of the changes in physical properties and mineral content of enamel exposed to radiation after treating with remineralization agent. *Clin Oral Investig.* 2022 Sep;26(9):5673-5685.

Duruk G, Acar B, Temelli Ö. Effect of different doses of radiation on morphological, mechanical and chemical properties of primary and permanent teeth-an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2020 Sep1;20(1):242.

Duverger O, Beniash E, Morasso MI. Keratins as components of the enamel organic matrix. *Matrix Biol* 2016 May-Jul;52 (54):260-265.

Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.* 1983;17(5):385-91.

Gislon LC, Curado MP, López RVM, de Oliveira JC, Vasconcelos de Podestá JR, Ventorin von Zeidler S et al. Risk factors associated with head and neck cancer in former smokers: A Brazilian multicentric study. *Cancer Epidemiol.* 2022 Jun; 78:102143.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci.* 2011 Jan 1;3(2):711-35.

Gonçalves LM, Palma-Dibb RG, Paula-Silva FW, Oliveira HF, Nelson-Filho P, Silva LA et al. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. *J Dent*. 2014 Aug;42(8):986-92.

Gouvêa Vasconcellos AF, Palmier NR, Ribeiro ACP, Normando AGC, Morais-Faria K, Gomes-Silva W et al. Impact of Clustering Oral Symptoms in the Pathogenesis of Radiation Caries: A Systematic Review. *Caries Res*. 2020;54(2):113-126.

Gupta N, Pal M, Rawat S, Grewal MS, Garg H, Chauhan D et al. Radiation-induced dental caries, prevention and treatment - A systematic review. *Natl J Maxillofac Surg*. 2015 Jul-Dec;6(2):160-6.

Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the radiologist*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012. *Physics and Chemistry of Radiation Absorption*; p. 3-11.

Hegde MN, Gatti P, Hegde ND. Protection of wear resistance behaviour of enamel against electron beam irradiation. *BDJ Open*. 2019 Jul;11(5):11.

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 Jan;28(1):66-73.

Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*. 1998 Mar;22(3):181-7.

Kudkuli J, Agrawal A, Gurjar OP, Sharma SD, Rekha PD, Manzoor MA et al. Demineralization of tooth enamel following radiation therapy; An *in vitro* microstructure and microhardness analysis. J Can Res Ther. 2020; 16:612-8.

Laura QM, Chow MD. Head and Neck Cancer. N Engl J Med. 2020 Jan 2;382(1):60-72.

Liang X, Zhang JY, Cheng IK, Li JY. Effect of high energy X-ray irradiation on the nano-mechanical properties of human enamel and dentine. Braz Oral Res. 2016;30: S1806-83242016000100209.

Lieshout HF, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue--a systematic review. Clin Oral Investig. 2014 Jan;18(1):17-24.

Lopes CCA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. Appl Spectrosc Rev. 2018a; 53(9):747–769.

Lopes CCA, Soares CJ, Lara VC, Arana-Chavez VE, Soares PB, Novais VR. Effect of fluoride application during radiotherapy on enamel demineralization. J Appl Oral Sci. 2018b Dec 10;27:e20180044.

Lu H, Zhao Q, Guo J, Zeng B, Yu X, Yu D et al. Direct radiation-induced effects on dental hard tissue. Radiat Oncol. 2019 Jan 11;14(1):5.

Madrid CC, de Pauli Paglioni M, Line SR, Vasconcelos KG, Brandão TB, Lopes MA et al. Structural Analysis of Enamel in Teeth from Head-and-Neck Cancer Patients Who Underwent Radiotherapy. *Caries Res.* 2017;51(2):119-128.

Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016 Mar;91(3):386-96.

Mitić Ž, Stolić A, Stojanović S, Najman S, Ignjatović N, Nikolić G et al. Instrumental methods and techniques for structural and physicochemical characterization of biomaterials and bone tissue: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Oct 1;79:930-949.

Muñoz MA, Garín-Correa C, González-Arriagada W, Quintela Davila X, Häberle P, Bedran-Russo A et al. The adverse effects of radiotherapy on the structure of dental hard tissues and longevity of dental restoration. *Int J Radiat Biol.* 2020 Jul;96(7):910-918.

Nanci A. Ten Cate's Oral histology: Development, structure, and function. 9th ed. St.Luis: Elsevier. 2018a. Dentin-pulp Complex. p.370- 443.

Nanci A. Ten Cate's Oral histology: Development, structure, and function. 9th ed. St.Luis: Elsevier. 2018b. Enamel: composition, formation, and structure. p.288- 369.

Noouailhetas Y. Radiações Ionizantes e a vida. Disponível em: < <https://www.gov.br/cnen/pt-br/material-divulgacao-videos-imagens-publicacoes/publicacoes-1/radiacoesionizantes.pdf/view>>. [2022 29 jul].

Palmier NR, Migliorati CA, Prado-Ribeiro AC, de Oliveira MCQ, Vechiato Filho AJ, de Goes MF et al. Radiation-related caries: current diagnostic, prognostic, and management paradigms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2020 Jul;130(1):52-62.

Paredes WEB, de Andrade DA ATR-FTIR Assessment of the Biochemical Composition and Micro Hardness of the Hard Tissues of Oral Cavity Submitted to Gamma Irradiation. *J Cancer Sci Ther*. 2017; (9): 379-388.

Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *J Bone Miner Res*. 2001 Oct;16(10):1821-8.

Qing P, Huang S, Gao S, Qian L, Yu H. Effect of gamma irradiation on the wear behaviour of human tooth enamel. *Sci Rep*. 2015 Jun 23;5:11568.

Reed R, Xu C, Liu Y, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. *Arch Oral Biol*. 2015 May;60(5):690-7.

Rodrigues RB, Soares CJ, Junior PCS, Lara VC, Arana-Chavez VE, Novais VR. Influence of radiotherapy on the dentin properties and bond strength. *Clin Oral Investig*. 2018 Mar;22(2):875-883.



Slimani A, Nouioua F, Desoutter A, Levallois B, Cuisinier FJG, Tassery H, et al. Confocal Raman mapping of collagen cross-link and crystallinity of human dentin-enamel junction. *J Biomed Opt.* 2017 Aug;22(8):1-8.

Seyedmahmoud R, Wang Y, Thiagarajan G, Gorski JP, Reed Edwards R, McGuire JD et al. Oral cancer radiotherapy affects enamel microhardness and associated indentation pattern morphology. *Clin Oral Investig.* 2018 May;22(4):1795-1803.

Shellis RP, Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:163-79.

Skiba-Tatarska M, Kusa-Podkańska M, Surtel A, Wysokińska-Miszczuk J. The side-effects of head and neck tumors radiotherapy. *Pol Merkur Lekarski.* 2016 Jul 29;41(241):47-49.

Strojan P, Hutcheson KA, Eisbruch A, Beitler JJ, Langendijk JA, Lee AWM. et al. Treatment of late sequelae after radiotherapy for head and neck cancer. *Cancer Treat Rev.* 2017 Sep; 59:79-92.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.

Winqvist E, Agbassi C, Meyers BM, Yoo J, Chan KKW; Head and Neck Disease Site Group. Systemic therapy in the curative treatment of head and neck squamous cell cancer: a systematic review. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017 Apr 4;46(1):29.

Wu L, Geng K, Gao Q. Effects of different anti-carries agents on microhardness and superficial microstructure of irradiated permanent dentin: an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2019 Jun 14;19(1):113.

Xu C, Wang Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. *Arch Oral Biol.* 2012 Apr;57(4):383-91.

Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem.* 2012; 52:113-33.

**ANEXO**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) e instituições coparticipantes Fundação Antônio Prudente e Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON), sob o parecer nº 5.467.402.

**Anexo1-** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



UNIVERSIDADE DO VALE DO  
ITAJAÍ-UNIVALI / SANTA  
CATARINA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** EFEITO DE DOSES TERAPÊUTICAS DE RADIOTERAPIA SOBRE A MORFOLOGIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICRODUREZA DO ESMALTE E DA DENTINA DE DENTES PERMANENTES.

**Pesquisador:** Fábio de Abreu Alves

**Área Temática:**

**Versão:** 7

**CAAE:** 90054118.4.0000.0120

**Instituição Proponente:** Universidade do Vale do Itajaí

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.467.402

#### **Apresentação do Projeto:**

O Projeto ao qual se refere está emenda, obteve sua aprovação junto a este CEP em 10 de dezembro de 2019 (PARECER CONSUBSTANCIADO Número 3.755.666).

O objetivo do estudo é avaliar a ultraestrutura, composição química e microdureza do esmalte e da dentina de dentes permanentes submetidos a doses terapêuticas de irradiação in vitro. Trata-se de um estudo experimental qualitativo e quantitativo. A amostra é composta por 78 dentes humanos, concedidos para uso nesta pesquisa através da constituição de um biorrepositório atrelado a este projeto de pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por parte da concedente. Os dentes coletados através do biorrepositório foram analisados em uma lupa e foram selecionados para o estudo os que não apresentavam falhas, trincas ou defeitos estruturais. Constituiu-se 2 grupos: NIR dentes não irradiados

**Endereço:** Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 88.302-901

**UF:** SC

**Município:** ITAJAI

**Telefone:** (47)3341-7738

**Fax:** (47)3341-7744

**E-mail:** etica@univali.br



Continuação do Parecer: 5.467.402

(n=26) – controle; IVT: dentes irradiados in vitro (n=26) - experimental. As porções coronárias foram separadas da porção radicular realizando um corte 5mm abaixo da junção amelo-dentinária. No centro de cada coroa dentária foi realizado um corte no sentido méso-distal e outro no sentido vestibulo-lingual obtendo-se 4 hemisseções, das quais 3 foram utilizadas para a análise da microdureza, análise morfológica através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), análise de elementos químicos por Espectroscopia de Dispersão de Energia de raio X (energy-dispersive X-ray spectroscopy- EDX) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy- FTIR) antes (NIR) e após a radiação (IVT). As leituras foram realizadas no esmalte e serão realizadas na dentina. Os resultados da microdureza e FTIR serão submetidos à ANOVA 2-way e as médias comparadas pelo teste Tukey em um nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). As imagens obtidas pelo MEV serão analisadas qualitativamente.

O objetivo da EMENDA apresentada pelos pesquisadores é a inclusão da análise da dentina, além da análise do esmalte, já prevista no projeto aprovado. Para tanto a emenda solicita a alteração do título do projeto para “EFEITO DE DOSES TERAPÊUTICAS DE RADIOTERAPIA SOBRE A MORFOLOGIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICRODUREZA DO ESMALTE E DA DENTINA DE DENTES PERMANENTES”.

A emenda também solicita retirada de um dos grupos. O grupo composto por dentes irradiados in vivo. Neste grupo os dentes seriam concedidos por pacientes submetidos a radioterapia na região de cabeça e pescoço e que tiveram perdas dentárias em virtude deste tratamento. A exclusão deste grupo assim como da coleta de dados de prontuários que seriam coletados destes mesmos pacientes descritos anteriormente, acarretará a dispensa TCLE atrelado a estes pacientes. Assim como do “Termo de utilização de dados”.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Mantém-se os mesmos.

**Endereço:** Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 88.302-901

**UF:** SC

**Município:** ITAJAI

**Telefone:** (47)3341-7738

**Fax:** (47)3341-7744

**E-mail:** etica@univali.br



Continuação do Parecer: 5.467.402

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

As alterações solicitadas por meio da presente emenda não impactam em aumento de riscos para a pesquisa e não resulta em alteração dos benefícios propostos no projeto aprovado. Portanto, a análise de riscos e benefícios mediante a emenda apresentada, não é um impeditivo à sua aprovação.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Proposta de pesquisa apresentada com clareza e objetividade. Os pesquisadores apresentaram todo o percurso metodológico para desenvolvimento da mesma, estando todas as etapas condizentes com as prerrogativas da resolução CNS n.466/2012 e suas complementares

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os Termos de apresentação obrigatória estão em conformidade e anexados na Plataforma Brasil, com as devidas assinaturas (quando aplicável).

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O protocolo está APROVADO, por estar em acordo com as prerrogativas éticas exigidas nas resoluções CNS 466/12 e suas complementares.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme Resolução CNS 466/12 VII. 13 cabe ao CEP: d) acompanhar o desenvolvimento dos projetos através de relatórios anuais dos pesquisadores. Deste modo, os pesquisadores devem informar o CEP sempre que houver mudanças no protocolo, por meio de submissão para análise da Emenda de protocolo, e devem apresentar relatórios parciais periodicamente e relatório final após conclusão do trabalho.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_190875_1_E3.pdf	25/04/2022 21:08:08		Aceito
Outros	cartapararespostasapendencias.pdf	25/04/2022 21:06:28	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	Termodecienciaeaquiescencia.pdf	09/03/2022 10:30:35	Renata Muniz Ventura Dias	Aceito
Outros	cartaemendanovotitulo.pdf	07/03/2022 23:58:04	Maria Mercês Aquino Gouveia	Aceito

**Endereço:** Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 88.302-901

**UF:** SC

**Município:** ITAJAI

**Telefone:** (47)3341-7738

**Fax:** (47)3341-7744

**E-mail:** etica@univali.br



UNIVERSIDADE DO VALE DO  
ITAJAÍ-UNIVALI / SANTA  
CATARINA



Continuação do Parecer: 5.467.402

Outros	cartaemendanovotitulo.pdf	07/03/2022 23:58:04	Farias	Aceito
Outros	tclebiorrepositorionovotitulo.pdf	07/03/2022 23:55:58	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	compromissodepesquisa.pdf	07/03/2022 23:50:17	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	aceitedeorientacao.pdf	07/03/2022 23:38:36	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoemenda2022.pdf	07/03/2022 23:36:56	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	07/03/2022 23:34:35	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	submissaoemenda.pdf	05/04/2021 10:49:25	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Orçamento	orcamentofianceiro.pdf	05/04/2021 10:48:36	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	identificacaodoscurriculosnaplataformala ttes.pdf	05/04/2021 10:48:03	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	formulariodesubmissao.pdf	05/04/2021 10:46:00	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	declaracaosobreusoedestinodomaterialb iologicopublicacaodedadosepropriedade dasinfirmaoesgeradas.pdf	05/04/2021 10:44:40	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	declaracaodecomprometimentodainstitui caocoparticipante.pdf	05/04/2021 10:42:40	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	declaracaodecienciaecomprometimento. pdf	05/04/2021 10:40:41	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	solicitacaodeisencaodetermodeconsenti mentolivreesclarecido.pdf	18/02/2021 15:30:17	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	solicitacaodeautorizacaoapararealizaod epesquisa.pdf	18/02/2021 15:29:46	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	formulariosupervisorlocal.pdf	18/02/2021 15:25:50	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	cartaemenda.pdf	18/02/2021	Maria Mercês	Aceito

**Endereço:** Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 88.302-901

**UF:** SC

**Município:** ITAJAI

**Telefone:** (47)3341-7738

**Fax:** (47)3341-7744

**E-mail:** etica@univali.br



UNIVERSIDADE DO VALE DO  
ITAJAÍ-UNIVALI / SANTA  
CATARINA



Continuação do Parecer: 5.467.402

Outros	cartaemenda.pdf	15:25:18	Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	cartaanuenciaCEPON.pdf	18/02/2021 15:24:35	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	autorizacaoradioterapiamedico.pdf	18/02/2021 15:24:13	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	autorizacaofisico.pdf	18/02/2021 15:22:15	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	termodeaceitedeorientacao.pdf	05/12/2019 15:06:43	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termoutilizacaodados.pdf	05/12/2019 15:04:59	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termocompromissopesquisa.pdf	05/12/2019 15:04:36	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termocienciabiorrepositorio.pdf	05/12/2019 15:02:37	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompleto.pdf	05/12/2019 15:00:38	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcledados.pdf	05/12/2019 14:58:49	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclebiorrepositorio.pdf	05/12/2019 14:58:09	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito
Outros	cartarespostavf.pdf	23/07/2018 15:08:41	Maria Mercês Aquino Gouveia Farias	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 88.302-901

**UF:** SC

**Município:** ITAJAI

**Telefone:** (47)3341-7738

**Fax:** (47)3341-7744

**E-mail:** etica@univali.br





UNIVERSIDADE DO VALE DO  
ITAJAÍ-UNIVALI / SANTA  
CATARINA



Continuação do Parecer: 5.467.402

ITAJAI, 13 de Junho de 2022

---

**Assinado por:**  
**Pollyana Bortholazzi Gouvea**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 88.302-901

**UF:** SC

**Município:** ITAJAI

**Telefone:** (47)3341-7738

**Fax:** (47)3341-7744

**E-mail:** etica@univali.br