



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

CLÁUDIO MOREIRA JÚNIOR

**ANÁLISE ESTRUTURAL COMPARATIVA DE DENTINA
HUMANA EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA**

2021

CLÁUDIO MOREIRA JÚNIOR

**ANÁLISE ESTRUTURAL COMPARATIVA DE DENTINA
HUMANA EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Dentística. Linha de pesquisa: Avaliação Clínica e Laboratorial de alterações da Estrutura Dental, de Materiais e de Técnicas de prevenção e Tratamento em Dentística.

Orientador: Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

Coorientadora: Prof. Dra. Denise Maria Zezell

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Moreira Júnior, Cláudio

Análise estrutural comparativa de dentina humana em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia / Cláudio Moreira Júnior. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientador: Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

Coorientadora: Denise Maria Zezell

1. Radioterapia. 2. Dentina. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Espectrometria por raios X. 5. Espectrometria de fluorescência. I. Gonçalves, Sérgio Eduardo de Paiva, orient. II. Zezell, Denise Maria, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Dr. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Ass. Dra. Maria Filomena Rocha Lima Huhtala

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Claudio Antonio Federico

Instituto de Estudos Avançados (IEAv)

Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial – DCTA

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 03 de setembro de 2021.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Silvia Regina Martins Moreira** (“dona Silvinha”), por aceitar e abraçar a desafiadora ideia de fazermos um mestrado durante o período mais turbulento de nossas vidas, a partir de um sonho.

Ao meu pai, **Cláudio Moreira** (*in memoriam*), por, em uma tarde de sábado na piscina, ter dito: “você devia ser **professor**”.

AGRADECIMENTOS

Aos meus **pais**, pela maluca ideia de aceitarem terem um filho que quer ser dentista, fotógrafo, professor, designer e tantas outras coisas ao mesmo tempo e misturado.

Aos professores membros da banca **Maria Filomena Rocha Lima Huhtala** e **Claudio Antonio Federico**, bem como os professores membros da banca de EGQ **João Maurício Ferraz da Silva** e **Eduardo Bresciani**, pela disponibilidade e ajuda na avaliação e correção deste trabalho; mas também pelos ensinamentos passados na graduação e pós-graduação que agregariam de forma tão significativa para que eu decidisse me tornar um professor.

Aos profs. **Denise Maria Zezell**, **Claudia Bianchi Zamataro** e **Marcos Antonio Scapin**, bem como todos os outros funcionários e alunos do **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)** e **Centro de Lasers e Aplicações (CLA)**, situados na USP - SP, por toda a orientação, ensinamentos e maravilhosa acolhida durante os vários dias passados no laboratório (ou no refeitório comendo). Com toda certeza este trabalho jamais, sob hipótese alguma, teria sido possível não fosse a tão incrível parceria realizada com todos.

À **UNESP - Universidade Estadual Paulista**, minha segunda casa, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa. Rebecca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Claudio Talge.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora**, aos docentes e ao departamento de Odontologia Restauradora, em especial à disciplina de **Dentística**, que, tanto professores, funcionários e alunos, deram-me o incrível privilégio de conhecer, exercer e agora ensinar ainda mais esta área tão incrível da nossa profissão.

Ao **Projeto Onco**, na pessoa do coordenador prof. **Lucio Murilo dos Santos**, e do prof. **Max Neisser**, pela possibilidade dada a mim de realizar este trabalho e, muito principalmente, por nos mostrar a fragilidade que a odontologia restauradora ainda se encontra e a necessidade urgente de ter um olhar mais apurado para pacientes que necessitam de ajuda.

A **Victoria Garcia de Carvalho**, pela amizade, ajuda e incentivo de sempre desde 2014; mas muito principalmente pela disponibilidade nos mais diversos cafés, *brunchs* e mesas de bares; seja para falar da vida e dar conselhos que não tenho a tendência de seguir, seja para sugerir ideias que viriam a se tornar um trabalho de dissertação.

A **Amanda Rossato**, pela amizade e a possibilidade de evidenciar como a pós-graduação pode agregar em nossa vida não apenas em termos acadêmicos e científicos ao se fazer uma análise estatística, mas muito principalmente nos incríveis relacionamentos e transformações de vida que surgem durante este período.

Aos amigos **Marcos Antônio** e **Larissa Braz**, pela amizade que perdura e que irá permanecer, nos dias bons e ruins e nos altos e baixos; e principalmente pelo incentivo de sempre nos meus projetos e planos, mesmo tendo que aguentar meu recorrente mau humor.

A **Cassio** e **Graziela Higashibara**, por inconscientemente (ou não) terem apresentado e despertado a odontologia em mim e dado as mais diversas possibilidades profissionais e de vida, através de um período de férias com um Playstation 4 e uma televisão nova.

A **Pedro Henrique Condé de Oliveira Prado**, pela amizade, parceria e ensinamentos de sempre, seja na hora de fazer um *click*, seja na hora de mostrar os motivos para se contar.

Aos amigos de mestrado **Stephanie, Alexandre, Vanessa, Tamires** e aos vários outros colegas de pós-graduação da Dentística, Prótese Dentária, Endodontia e Periodontia por tornarem esse período muito mais divertido e leve.

Aos amigos de “Chat”, **Adam, Ariane, Bruno, Gabriela, Guilherme, Eduardo, Igor, Isma, Lizandra, Matheus, Pedro, Thiago, Yuri**, pelas conversas, estímulos, conselhos e risadas de sempre.

Aos muitos professores que vieram, permaneceram e foram durante minha vida, exercendo a docência e demonstrando o privilégio que é se estar em uma sala de aula; em especial ao meu orientador, professor **Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves**, que abraçou a complexa e conflituosa ideia de ser meu orientador e poder me ensinar ainda mais, mas principalmente por acreditar na possibilidade de trabalharmos juntos. Costumo dizer aos alunos mais novos que buscam a pós-graduação que eu, especificamente, fui extremamente feliz durante meu mestrado, e com certeza isso aconteceu por sua ajuda. Afinal, fazemos o que fazemos porque acreditamos; mas somente acreditamos pois amamos o que fazemos. Obrigado por nos ensinar todos os dias, acreditando e amando a docência, sempre com um sorriso no rosto.

Fazemos o que fazemos
porque **acreditamos**;
Mas somente acreditamos
porque nos foi **ensinado**.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
3 PROPOSIÇÃO	17
3.1 Objetivos específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Obtenção e preparo dos dentes	20
4.2 Microdureza de Superfície (MDS)	21
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
4.4 Espectroscopia por Energia de Difração de Raios X (EDS)	26
4.5 Espectometria de Fluorescência de Raios X	27
4.6 Interrelação e Validação EDS x Fluorescência de Raios X	29
5 RESULTADO	33
5.1 Microdureza de Superfície (MDS)	33
5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
5.3 Espectroscopia por Energia de Difração de Raios X (EDS)	37
5.4 - Interrelação e Validação EDS x Fluorescência	41
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

Moreira Júnior C. Análise estrutural comparativa de dentina humana em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço está entre as neoplasias mais prevalentes, sendo seu tratamento realizado por cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação destes, dependente de fatores como tipo e localização. O método radioterápico destaca-se por ser um método menos invasivo, com possibilidade de regressão da doença e prevenção de possíveis reincidências. Porém, mudanças estruturais e morfológicas podem acontecer nos tecidos duros dentários ao serem irradiados durante o tratamento. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar “*in vivo*” a influência da radioterapia para tratamento do câncer de cabeça e pescoço sobre a estrutura da dentina humana. Foram utilizados dentes extraídos por motivos periodontais e/ou sujeitos a gerar processos infecciosos graves em caráter de urgência, tanto de pacientes que realizaram radioterapia devido ao diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, como de pacientes saudáveis, aos quais foram separados em dois grupos: Controle (n=12 dentes - dentina de pacientes saudáveis); Irradiado (n=12 dentes - dentina de pacientes irradiados). Os dentes foram seccionados ao meio, obtendo-se duas metades (n=24) para cada grupo. Ambos os grupos (n=24) foram analisados por técnicas não destrutivas: análises de Microdureza de Superfície (MDS), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS); e os dados obtidos através de EDS foram correlacionados, realizando sua validação matemática, com análise de Fluorescência de Raios X. A análise de MDS não encontrou diferenças significativas; a análise por MEV encontrou diferenças visuais significativas entre as imagens obtidas; a análise por EDS encontrou diferenças significativas nas comparações entre Cálcio e Fósforo ($p=0,000$ e $p=0,037$, respectivamente), evidenciando redução de Ca e aumento de P no grupo que sofreu radiação. A correlação matemática foi validada, com padrões satisfatórios de aceitabilidade da precisão e da exatidão na técnica utilizada.

Palavras-chave: Radioterapia. Dentina. Microscopia eletrônica de varredura. Espectrometria por raios X. Espectrometria de fluorescência.

Moreira Júnior C. Comparative structural analysis of human dentin in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

Head and neck cancer is among the most prevalent cancers, and its treatment is performed by surgery, radiotherapy, chemotherapy or a combination of these, depending on factors such as type and location. The radiotherapy method stands out for being a less invasive method, with the possibility of disease regression and prevention of possible recurrences. However, structural and morphological changes may occur in dental hard tissues when irradiated during treatment. Thus, the aim of this study will be to evaluate “in vivo” the influence of radiotherapy to treat head and neck cancer on the structure of human dentin. Teeth extracted for periodontal reasons and/or subject to urgent serious infectious processes will be used, both from patients who underwent radiotherapy for the diagnosis of head and neck cancer and from healthy patients, who will be separated into two groups: Control (n = 12 teeth - dentin of healthy patients); Irradiated (n = 12 teeth - dentin from irradiated patients). The teeth were sectioned in half, obtaining two halves (n = 24) for each group. Both groups (n = 24) were arranged by non-destructive techniques: Surface Microhardness (MDS), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) analysis; and the data obtained through EDS were correlated, performing its mathematical validation, with X-Ray Fluorescence analysis. MDS analysis did not find differences; SEM analysis found relevant visual differences between the customized images; EDS analysis found differences in the comparisons between Calcium and Phosphorus ($p = 0.000$ and $p = 0.037$, respectively), showing a reduction in Ca and an increase in P in the group that underwent radiation. Mathematical correlation was validated, with acceptability standards of precision and accuracy in the technique used satisfactory.

Keywords: Radiotherapy. Dentin. Scanning electron microscopy. X-ray emission spectroscopy. Fluorescence spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço ocupa o sétimo lugar entre as neoplasias mais comuns no mundo, com uma incidência anual de aproximadamente 640.000 novos casos (Ferlay et al., 2010; Paiola et al., 2018), sendo o quarto mais frequente na região Sudeste do Brasil no sexo masculino (Santos, 2018). A prevalência do comprometimento odontológico restaurador em pacientes oncológicos também é alta (Deng et al., 2015), principalmente quando envolve fatores associados a hábitos prejudiciais, como o tabagismo e ingestão de bebidas alcoólicas (Anantharaman et al., 2011).

A radioterapia destaca-se como opção de eleição para o tratamento da doença, por promover maior preservação dos tecidos e estruturas adjacentes (Shah et al., 2009; Huang, O'Sullivan, 2013), possibilidade de regressão da doença, diminuição do volume tumoral, prevenção de possíveis reincidências tumorais e metástases, e até mesmo cura total do câncer (Eriksson et al., 2010).

Sabe-se que há mudança estrutural deletéria dos tecidos mineralizados dos elementos dentários durante tratamentos de radioterapia na região de cabeça e pescoço (Reed et al., 2015), bem como profundas alterações nos tecidos adjacentes e no equilíbrio do sistema estomatognático por conta da diminuição da quantidade e qualidade do fluxo salivar, da sua capacidade tampão, concentração e saturação de Cálcio e Fósforo com relação a saliva produzida por glândulas não irradiadas. Adicionalmente, ocorrem alterações no limiar de dor e funcionamento dos tecidos moles adjacentes (Goldstein et al., 1999; Rose-Ped et al., 2002; Vissink et al., 2003), sugerindo que todo tipo de intervenção odontológica seja realizada antes do tratamento radioterápico (Silva et al., 2010; Deng et al., 2015; Madrid Troconis et al., 2017). Outra complexa co-morbidade comum ao tratamento odontológico

pós-tratamento radioterápico é a osteorradionecrose, que se caracteriza pela não cicatrização tecidual e comprometimento do osso adjacente ao órgão dental quando há intervenção invasiva no local (Chronopoulos et al., 2018).

No entanto, dada a gravidade e urgência para início do tratamento oncológico, por vezes as manobras prévias restauradoras não são finalizadas em tempo. A adesão de materiais restauradores aos tecidos alterados pela radiação fica severamente comprometida, refletindo-se em uma das principais deficiências do procedimento restaurador, sinalizando uma incapacidade do mesmo em reverter a possível alteração tecidual, já que não se conhece quais componentes teciduais, orgânicos e/ou inorgânicos, estão efetivamente alterados (Rodrigues et al., 2018).

Tais mudanças na micromorfologia dos tecidos mineralizados aumentam o risco de cárie e de outras co-morbidades (mucosite, xerostomia, etc), durante e após os protocolos clínicos de uso de radiação gama ou X para tratamento do câncer de cabeça e pescoço (Maio, 2009). Consequentemente, induzem a uma redução da ingestão diária de alimentos e nutrientes, levando a quadros de perda de peso e desnutrição, frequentes em pacientes oncológicos e coadjuvantes no aumento da morbidade e mortalidade dos indivíduos acometidos (Kohli et al., 2018). Porém, estudos demonstram que apenas a irradiação induzida no tecido mineralizado dental, como em aplicações “*in vitro*”, não possui a capacidade de modificar sua microdureza superficial ou induzir qualquer tipo de alteração molecular, mesmo em doses muito altas de radiação que seriam letais ao ser humano (Maio, 2009), dificultando a compreensão do fenômeno de mudança estrutural.

Da mesma forma, o entendimento da etiologia e comportamento diferenciado das cáries de radiação, de evolução rápida e sem sintomatologia, quando comparadas ao processo carioso convencional multifatorial e sacarose-dependente, também se mostra como uma grande lacuna no conhecimento frente ao atendimento clínico de pacientes

submetidos à radiação (Palmier et al., 2017). Por se tratar de um efeito secundário crônico da radioterapia, os atuais protocolos de tratamento compreendem ações paliativas para paralisar a doença e aliviar os sintomas (quando existem) (Maio, 2009), não havendo um consenso geral de como se reabilitar com eficiência pacientes que passaram pelo processo de radiação e sofrem com lesões rampantes de cárie.

Assim, entende-se ser de suma importância a busca por dados mais concretos para a compreensão dos possíveis efeitos da radiação sobre a dentição humana, a fim de oferecer real contribuição para o desenvolvimento de alternativas para amenizar ou mesmo eliminar os efeitos deletérios da radioterapia e cáries de radiação em pacientes com tumores de cabeça e pescoço durante o tratamento dental restaurador.

2 REVISÃO DA LITERATURA

As consequências da irradiação ionizante gama ou X sobre os tecidos dentais é ainda um campo controverso, muito provavelmente pela dificuldade em se conseguir amostras de tecidos dentais de pacientes submetidos à radioterapia, considerando o risco inerente de osteorradionecrose aliado às questões bioéticas (Chronopoulos et al., 2018), dificultando a correlação com pacientes saudáveis e com amostras criadas “*in vitro*”.

Os tratamentos específicos para câncer tendem a apresentar consequências negativas junto à possibilidade de controle e cura da doença. A radioterapia e a terapia de quimiorradiação concomitante (CCR) são tratamentos de eleição para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço localmente avançado, conseguindo promover maior preservação dos tecidos e estruturas adjacentes (Shah et al., 2009; Huang, O’Sullivan, 2013), embora encontrem-se relatos de toxicidade aguda e tardia profundas (Deng et al., 2015).

O tratamento radioterápico tem como mecanismos de ação a interação com o DNA da célula cancerígena, ocasionando a morte celular (apoptose); ou a radiólise da água gerando novas ligações químicas tóxicas às células (Eriksson et al., 2010; Okuno et al., 2013). Assim, este tratamento pode ter efeitos colaterais como osteorradionecrose, xerostomia, mucosite e possíveis alterações na estrutura dentária: vulnerabilidade à desmineralização dentária, hidrólise do conteúdo proteico e consequente maior agressividade do processo carioso (Jaward et al., 2015; Kostler et al., 2001). Tais efeitos colaterais variam de paciente a paciente, bem como parecem estar ligados a outros fatores sistêmicos e locais, como alteração da dieta e comprometimento estrutural da cavidade oral para alimentação e limpeza;

porém o surgimento de cáries dentárias com evolução acelerada e com prognóstico incerto, conhecidos como “cáries de radiação”, são comuns.

Revisões sistemáticas mostram que a prevalência de cárie de radiação para pacientes com câncer que foram irradiados varia entre 21% e 29% (Hong et al., 2010; Moore et al., 2020). Tal tipo de cárie agressiva e rampante pode se desenvolver em três meses após a radioterapia, com uma etiologia multifatorial de entendimento controverso, mas que resulta na destruição completa de uma dentição considerada previamente saudável (Moore et al., 2020).

Estudos *in vitro* indicaram que a radioterapia pode exercer efeitos diretos sobre a estrutura dentária, incluindo alterações na microdureza e/ou alterações nas estruturas micro-morfológicas do esmalte e dentina, bem como na composição química de tais tecidos duros (Reed et al., 2015; Deng et al., 2015), como mudanças na relação fosfato/cálcio, diminuição da relação orgânica/mineral e alterações no módulo de elasticidade dos tecidos duros. Alguns estudos “*in vitro*” também foram capazes de mostrar alterações na microdureza e resistência à tração da dentina por conta da mudança da matriz orgânica pela formação de radicais livres na presença de água, além de alterações do colágeno tipo I da dentina (Bernard et al., 2015; Rodrigues et al., 2017).

Considerando a estrutura da dentina, ela é caracterizada por um tecido composto mineralizado, tendo uma média de 70% da sua composição de matéria inorgânica, 20% de matéria orgânica e 10% de água em volume. Ao longo de sua estrutura existem canalículos que emergem da polpa em direção ao limite amelo-dentinário, responsáveis pela permeabilidade do tecido, por conter o fluido pulpar, além de prolongamentos odontoblásticos, que são projeções celulares do odontoblasto, situado na polpa e responsável pela neoformação dentinária reacional a estímulos externos. Revestindo tais canalículos, encontra-se a dentina peritubular, um tecido com elevado grau

de mineralização; e entre os túbulos a dentina intertubular, correspondente à maior parte da massa dentinária, menos mineralizada e com maior quantidade de matéria orgânica (Garberoglio, Brännström, 1976).

Existe uma correlação inversa entre microdureza e densidade tubular na dentina. Quanto mais profunda e próxima da câmara pulpar a dentina estiver, maior a densidade tubular e menor a microdureza, por conta da diminuição da dentina intertubular e um aumento no diâmetro dos túbulos; ou seja, por ocorrer um aumento de área “oca” no tecido, que estaria sendo preenchida por fluido e pelo prolongamento odontoblástico (Pashley et al 1985; Ten Cate, 2013; Naseri et al., 2019). Da mesma forma, quanto menos profunda e mais próxima do esmalte ou cimento, menor a densidade tubular, maior a quantidade de dentina intertubular, de matéria orgânica/inorgânica e do grau de microdureza.

Assim, eventos que possam promover alterações na estrutura molecular da matéria orgânica e inorgânica dos tecidos dentais, tais como alterações de microdureza (cristalinidade), alterações morfológicas de tamanho e formato dos túbulos dentinários, e mudanças iônicas na quantidade de elementos químicos de sua estrutura e de suas ligações poderiam ocasionar prejuízos a longo prazo nos dentes (Yamin et al., 2018).

Porém, grande parte dos trabalhos *in vitro* ainda oferecem explicações inconsistentes em mostrar estas diferenças e influências da radiação ionizante sobre os tecidos duros dentais (Gernhardt et al., 2004; Galetti et al., 2013; Gomes-Silva et al., 2016). Tais estudos sugerem que os diferentes tipos de metodologias aplicadas, e a dificuldade em se conseguir reproduzir condições semelhantes ao meio bucal de um paciente irradiado em um trabalho laboratorial controlado, ainda são obstáculos que dificultam a análise das mudanças que podem ocorrer na estrutura dentária e na cárie de radiação comparados a modelos *in vivo*. Alguns autores ainda sugerem que as dificuldades nas análises se devem ao fato dos tecidos duros dentais serem

resistentes à radiação e tais mudanças ocorrerem mais por influência de fatores externos à estrutura dentária, como a mudança da quantidade e qualidade de saliva, alteração na microbiota bucal, e de padrões alimentares e sociais dos pacientes submetidos a este tipo de tratamento (Kielbassa et al., 2006); e ainda, por fim, complementam que estas mudanças se devem não apenas a alterações salivares, dietéticas e microbiológicas, mas também a alterações na composição química da estrutura dentária agravada pelas condições sistêmicas do paciente (Lieshout, Bots, 2014).

Desta forma, a utilização e análise de amostras de pacientes que foram submetidos à radiação *in vivo* e teriam passado por influências sistêmicas passou a ser mais buscado na literatura e pesquisado, apesar da dificuldade em se conseguir tais amostras.

Rodrigues et al. (2017) demonstraram haver uma alteração na composição química através da formação de radicais livres de hidrogênio e peróxido de hidrogênio em amostras que sofreram radiação *in vivo* por tratamento radioterápico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Esses radicais livres, na presença de água, são capazes de atuar como uma fonte oxidante que pode causar desnaturação das estruturas moleculares das fibras colágenas, principalmente tipo 1 e 3, e quebra de algumas ligações químicas durante a radiação. Com isso, há uma reorganização dos componentes químicos e da estrutura do colágeno após a radioterapia, provocada por uma descarboxilação dos elos laterais do carboxilato responsável pela interação da matriz mineral com os cristais de hidroxiapatita.

Ainda, Rodrigues et al. (2017) sugerem ser possível visualizar nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) uma destruição da interação entre a dentina intertubular e peritubular, apresentando uma morfologia homogênea entre ambas e mostrando uma perda de continuidade entre essas duas estruturas, evidenciada por pontos de destruição e quebra entre elas. Tais achados podem estar associados à reorganização da estrutura

do colágeno que análises em FTIR (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier) mostraram, e que estariam associados ao comprometimento das propriedades mecânicas e adesivas da dentina.

Miranda et al. (2020) em um estudo utilizando também amostras coletadas de pacientes que sofreram tratamento radioterápico, sugerem que ocorre uma troca de íons fosfato-carbonato na hidroxiapatita capaz de aumentar ainda mais a concentração dos componentes orgânicos na dentina, deixando-a suscetível ao processo de desmineralização. Neste estudo, ao qual foram utilizadas amostras de dentes extraídos de pacientes submetidos à radiação *in vivo*, a análise por FTIR mostrou que a relação mineral/matriz orgânica foi menor no grupo irradiado por conta de um aumento de amida I pós radiação, o que corrobora com o argumento de mudanças na composição orgânica após a dose de radiação terapêutica. Da mesma forma, os autores também citam a complexidade de se conseguir evidências em trabalhos totalmente laboratoriais, demonstrando a importância de se utilizar amostras irradiadas *in vivo*, visto a dificuldade das pesquisas em demonstrarem tais mudanças.

A prevalência de processos cariosos também parece aumentar significativamente ao longo do tempo em pacientes que foram submetidos à radioterapia (Deng et al., 2015; Maio 2019). A cárie induzida por radioterapia possui um padrão em que normalmente se inicia perto da gengiva e circunda a zona cervical do dente. A perda de autolimpeza mecânica dessas superfícies, como resultado da diminuição do fluxo salivar, provavelmente explica essa localização (Bernard et al., 2015).

Sua evolução e prognóstico também são diferenciados e pouco entendidos (Palmier et al., 2017). Um estudo retrospectivo realizado em 314 pacientes com câncer de nasofaringe mostrou que a prevalência da doença dentária aumentou de 16% no primeiro ano após a radiação para 36%, 55% e 74% aos 3, 5 e 7 anos pós-tratamento, respectivamente (Deng et al., 2015).

Tais dados demonstram a dificuldade em se manter um paciente que passa e/ou passou por radioterapia sobre controle de saúde bucal.

Diante destas dificuldades, a escolha de protocolos de tratamento e de materiais restauradores baseia-se atualmente na experiência clínica pessoal e não na evidência científica (Madrid Troconis et al., 2017). Além disso, evidências já demonstram que a radioterapia poderia produzir mudanças químicas mínimas na microestrutura da resina composta, especialmente em sua matriz orgânica, não sendo relevantes para afetar negativamente as propriedades micromecânicas de superfície e volume (Madrid Troconis et al., 2017). A dificuldade clínica em se manter restaurações adesivas em pacientes submetidos à radioterapia estaria provavelmente mais ligada a alterações no substrato e à obtenção de uma adequada adesão.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é avaliar as mudanças químicas e morfológicas na dentina humana após tratamento de radioterapia para câncer de cabeça e pescoço “*in vivo*” por meio de testes “*in vitro*”.

3.1 Objetivos específicos:

- Realizar análise quantitativa de microdureza superficial do tecido dentinário controle e irradiado;
- Realizar análise quantitativa, qualitativa elementar e molecular inorgânica do tecido dentinário controle e irradiado;
- Realizar a validação da metodologia de análise quantitativa *in vitro* de Fósforo e Cálcio da dentina submetida a radiação ionizante pelos testes de MEV/EDS e Fluorescência de Raios X.

As hipóteses testadas foram:

H01 - A dentina submetida ao tratamento de radioterapia não apresentará alterações na microdureza superficial quando comparada ao grupo controle;

H02 - A dentina humana submetida ao tratamento de radioterapia não apresentará variação na composição química inorgânica quando comparados ao grupo controle.

H03 - Não se pode estabelecer relação entre as análises quantitativas de Fósforo e Cálcio por MEV/EDS e Fluorescência de Raios X.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa seguiu as diretrizes do CONSORT 2010. Foram utilizados 24 dentes extraídos em caráter de urgência por motivos periodontais e/ou sujeitos a gerar processos infecciosos, tanto de pacientes que realizaram radioterapia devido ao diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço (n=12), como de pacientes saudáveis (n=12). Os pacientes oncológicos foram triados, examinados e tratados na clínica de oncologia “Projeto ONCO” do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentos Humanos do ICT – UNESP (parecer 3.842.547), sendo escolhidos pacientes que tivessem tomado radiação total de 70 gray (Gy) de dose absorvida para o tratamento.

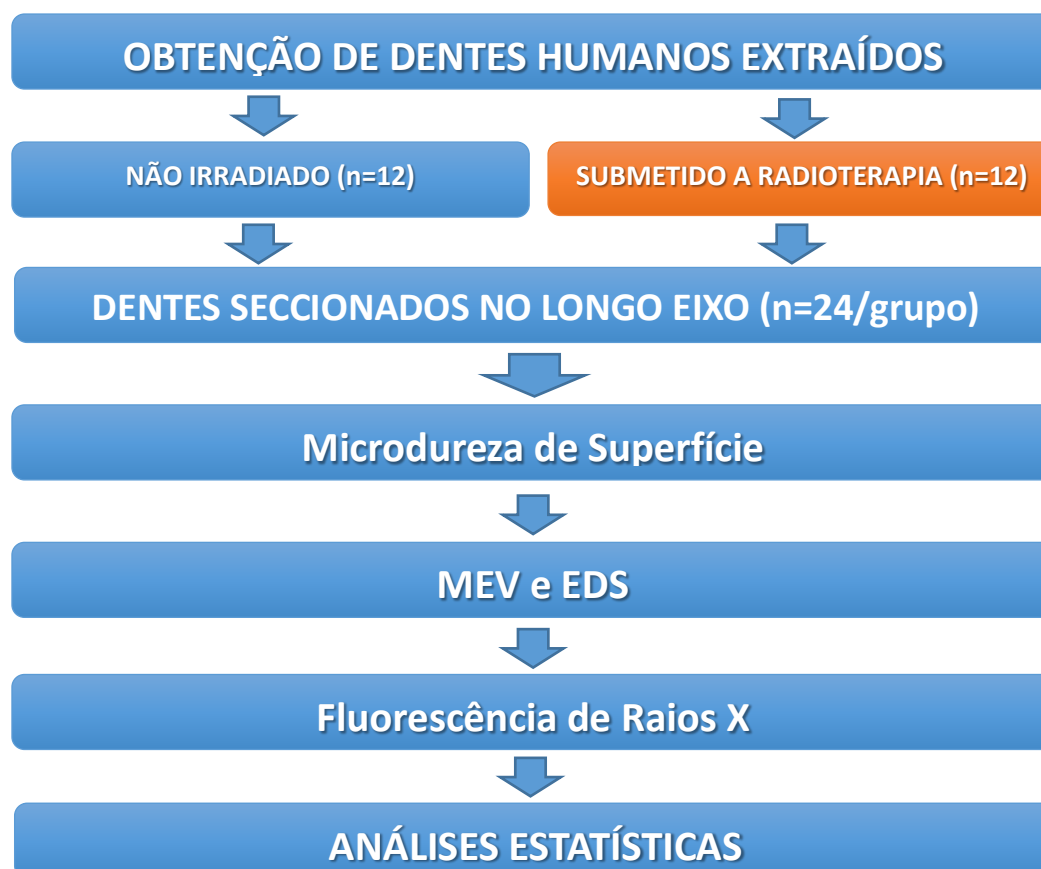
Os dentes obtidos foram separados em dois grandes grupos: Controle (n=12 dentes - dentina de pacientes saudáveis) e Irradiado (n=12 dentes - dentina de pacientes irradiados *in vivo*). Os dentes foram seccionados em seus longos eixos, obtendo duas metades (n=24 por grupo). Para cada grupo a dentina foi analisada por técnicas não destrutivas: Microdureza de Superfície (MDS), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Fluorescência de Raios X, sendo este último teste realizado na intenção de correlacionar com os resultados obtidos pelo EDS validando-o matematicamente em termos de precisão e exatidão.

Concomitantemente à realização da análise morfológica por meio de MEV, foi também utilizado um *software* (Quantax, EUA) para a análise por EDS. Esta última tem por finalidade realizar uma análise dos elementos químicos presentes na amostra. Foram selecionados os elementos componentes principais da hidroxiapatita (Cálcio e Fósforo), além dos elementos Carbono, Oxigênio e Flúor. Esta análise elementar foi

padronizada para uma área de superfície determinada de 20 μm . Os valores médios de porcentagem de massa (*net unkn. wt.%*) obtidos por área foram calculados e fornecidos pelo *software*. Cada amostra foi lida em quadruplicata por operador calibrado e calculado o valor médio das medidas obtidas em peso líquido nas diferentes regiões por amostra, com a finalidade de minimizar a interferência de pontos da amostra que pudessem ter sofrido des-remineralização antes da exodontia. Assim, foi obtido para cada amostra o valor quantitativo médio de seus elementos constituintes.

A seguir, por meio de Fluorescência de Raios X foi realizada a validação matemática dos dados obtidos por meio da análise por EDS.

Figura 1 - Representação esquemática da distribuição das amostras de acordo com as condições experimentais



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1 - Obtenção e preparo dos dentes

Os dentes foram desinfetados por solução de timol a 0,68 g/ q.s.p. L, por 48 horas, a fim de promover a desinfecção dos espécimes e evitar contaminação cruzada com os operadores. Em seguida, eles foram armazenados em potes de vidro estéreis preenchidos com água destilada tipo II, guardados em geladeira à 4° C por até 30 dias, com trocas de água destilada ao menos uma vez por semana. Os espécimes foram separados em dois grandes grupos: Controle (dentina de pacientes saudáveis, n=12 dentes); Irradiado (dentina de pacientes irradiados, n=12 dentes). Os dentes foram seccionados ao meio por uma cortadeira (Struers Accutom-5. Struers A/S, Ballerup, Denmark) (Figura 2), obtendo-se 24 metades que foram polidas planas (Zamataro et al., 2013) em politriz (Buehler, IL, EUA) com lixas de granulação 1200, 2400 e 4000 em ordem decrescente de granulação, sob irrigação abundante, por 30 segundos. Em seguida, foi realizado o ultra polimento com disco de feltro macio com suspensão de polimento monocristalino de diamante (MetaDi, Buehler, IL, EUA) sem irrigação. Finalmente, as amostras foram lavadas em temperatura ambiente na cuba ultrassônica com solução de água destilada e detergente enzimático.

Figura 2 - Cortadeira de amostras Struers Accutom-5



Legenda: Equipamento utilizado no corte para separação de todas as amostras ao meio (pertencente ao Centro de Laser e Aplicações - IPEN).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 - Microdureza de Superfície (MDS)

A avaliação da microdureza de superfície inicial de cada amostra polida foi realizada para permitir o cálculo da porcentagem de alteração de microdureza de superfície (%PDS) entre os grupos. O teste de microdureza de superfície é um indicador indireto do conteúdo mineral de tecidos e materiais. O princípio geral do teste de dureza está baseado em uma carga compatível com a resiliência do corpo de prova que, quando aplicada sobre ele, o deforma. Assim, nesta análise de dureza onde foi utilizada uma ponta Knoop, as endentações foram realizadas sob cargas constantes de 245.2 mN (HK0.025), com duração de 5 segundos. Cada amostra teve sua superfície

inferior previamente polida e fixada com cera pegajosa plastificada de maneira justaposta em placas de acrílico, para evitar báscula durante os testes. O grau de polimento foi analisado no microscópio óptico do equipamento (Shimadzu HMV-2000, Japão).

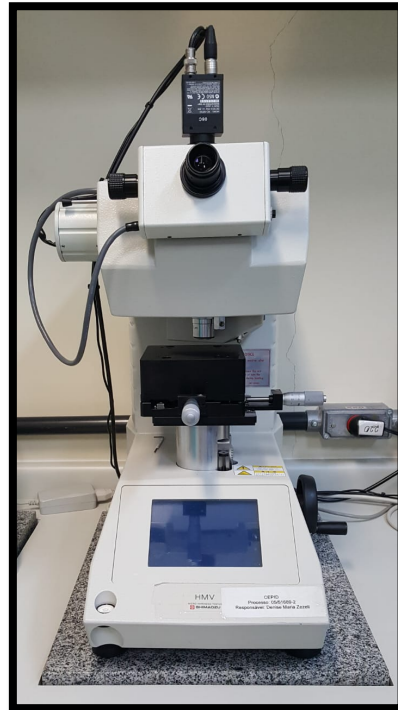
Quando se trata de tecidos biológicos, como os tecidos duros esmalte, dentina e osso humano ou bovino, a homogeneidade do universo amostral pode ficar comprometida apresentando uma grande variabilidade que é sentida durante a análise estatística. Para tanto, a MDS de *baseline* é realizada para homogeneizar o universo amostral inicial de ambos os grupos, evitando ou minimizando possíveis vieses dos resultados.

A carga foi aplicada perpendicularmente sobre a superfície da dentina, durante 5 segundos por meio de um microdurômetro (Shimadzu HMV-2000, Japão) provido de diamante piramidal (Figura 3). Foram realizadas onze endentações em cada espécime (Figura 4), cada uma em diferentes distâncias a partir de um ponto zero, este definido como a união cimento-dentina da amostra, seguindo a ordem: 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 micrômetros, na intenção de percorrer a amostra em profundidade e se obter a média de microdureza da estrutura. A distância do comprimento das endentações foi medida por meio do software do equipamento (HMV Shimadzu, Japão) e foi realizado o cálculo do número de dureza Knoop (KHN), obtido pela expressão:

$$\text{KHN} = 14230 \times C / l^2$$

Onde C é carga em gf, l é comprimento da endentação em μm . Para cada amostra foram calculadas sua média e desvio padrão. Em seguida, foi calculada a média e desvio padrão da microdureza de superfície dentre todas as médias do grupo controle, sendo esta a média *baseline* controle.

Figura 3 – Microdurômetro Shimadzu HMV-2000



Fonte: Elaborada pelo autor.

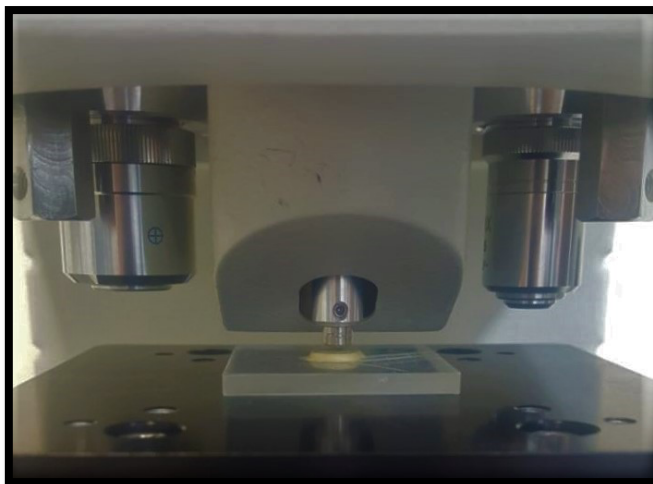
Após, foi realizada a média de cada grupo para o cálculo de variação de dureza de superfície em % entre os grupos Controle e Irradiado.

O cálculo da %VDS é matematicamente representado pela equação:

$$\% \text{ Variação de Dureza} = \frac{\text{MDS Controle Baseline} - \text{MDS Irradiado}}{\text{MDS Controle Baseline}} \times 100$$

Desta forma, foi feita uma análise de correlação entre o MDS no *baseline* e a porcentagem de variação de dureza de superfície.

Figura 4 – Microdurômetro Shimadzu HMV-2000 em funcionamento



Legenda: Foto aproximada no momento da endentação na amostra fixada.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

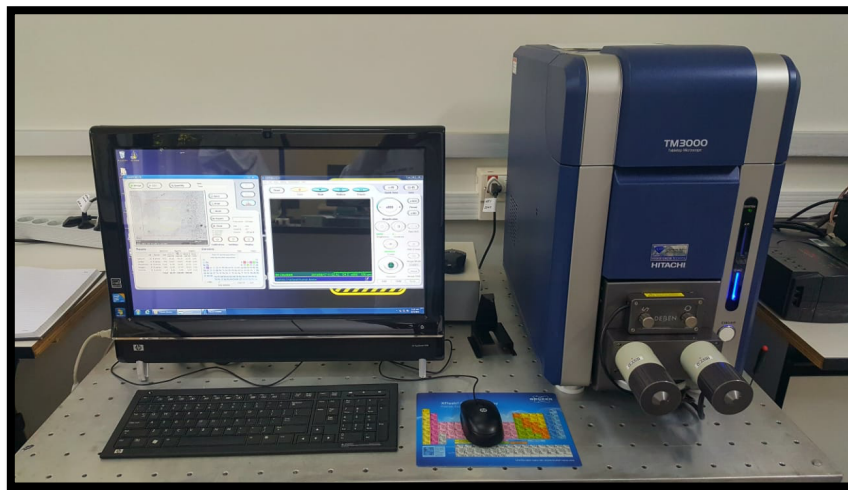
A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) possibilita a geração de uma imagem da superfície de dentina por meio da emissão de um feixe de elétrons onde uma parte dos elétrons primários incidentes pode ser retida nos átomos da amostra deslocando simultaneamente elétrons das órbitas destes átomos. Os elétrons ejetados pelo feixe de elétrons primários são referidos como elétrons secundários que quando emitidos promovem um desequilíbrio energético, pois os elétrons secundários possuem um nível de energia inferior ao dos elétrons primários. Esta diferença de energia é dissipada em forma de Raios X, que é característico em termos de energia e de comprimento de onda (λ) para cada elemento exposto ao feixe de elétrons primário. Porém deve-se levar em conta que a parte da amostra que emite

elétrons secundários captados para a geração da imagem, é de superfície e restringe-se à área iluminada pelo feixe e que define a resolução da MEV (Kitajima, Leite, 1999).

As amostras foram submetidas à análise em Microscópio Eletrônico de Varredura TM 3000 Tabletop Microscope (Hitachi, Japan) (Figura 5) com tensão de 5 kV, que dispensa a metalização. Para cada amostra analisada foram obtidas, no mínimo, sete imagens em diferentes aumentos pré-determinados: a primeira imagem foi realizada com a magnificação de 200 X para verificação da superfície da amostra, seguida por imagens de 400, 800, 1.500, 3.000, 6.000 e 12.000 X. Foram observados os aspectos estruturais da dentina, comparando entre ambos os grupos se haveria diferenças visuais na conformação e tamanho do diâmetro dos túbulos dentinários, bem como presença de trincas e mudanças estruturais na dentina inter e/ou peritubular.

Foi utilizado um porta amostra metálico como gabarito para o correto posicionamento da amostra previamente preparada, de forma a padronizar sua posição dentro do equipamento durante as análises. Em seguida, a amostra foi posicionada dentro da câmara de vácuo do equipamento, na posição desejada, fechada e realizado vácuo para início das análises.

Figura 5 – Microscópio Eletrônico de Varredura TM 3000 Tabletop Microscope



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 - Espectroscopia por Energia de Difração de Raios X (EDS)

No mesmo equipamento TM 3000 Tabletop Microscope (Hitachi, Japan) (Figura 5), seguindo os mesmos princípios da microscopia eletrônica de varredura, foi utilizado o *software* Quantax (Bruker, EUA) para a análise elementar dos componentes da dentina. Foram previamente selecionados os elementos químicos presentes na hidroxiapatita e demais elementos relevantes para o objetivo deste estudo: Cálcio, Fósforo, Hidrogênio, Flúor e Carbono, analisados em uma área padronizada pré-determinada pelo *software*.

A técnica caracteriza-se pelo efeito fotoelétrico que ocorre quando uma energia incide sobre o átomo a ser analisado deslocando o elétron mais próximo do núcleo para uma órbita mais externa, tornando-se excitado. Este

estado excitado é instável e o elétron deslocado tende a voltar a sua órbita original, emitindo “um pacote de energia” denominado fóton.

Cada elemento atômico possui uma energia de deslocamento específica e capaz de ser lida e analisada. Elementos mais pesados como o Cálcio apresentam dois deslocamentos diferentes ($\text{CaK}\alpha$ e $\text{CaK}\beta$), dependendo do elétron que é deslocado e de qual camada eletrônica em que tal elétron é excitado, considerando sua proximidade com o núcleo atômico. Tais deslocamentos são capturados e expressos numericamente pelo próprio *software*, realizando uma análise quantitativa e qualitativa da presença dos elementos pesquisados.

Foi realizada a análise elementar por EDS em todas as amostras, de ambos os grupos. A primeira análise individual foi realizada com uma magnificação de 200 X. A segunda análise foi realizada em quadriplicada, dividindo cada amostra em quadrantes e realizando uma análise em cada quadrante, com uma magnificação de 1000 X. Esta leitura em quadriplicada aumenta a confiabilidade do dado diminuindo o erro experimental comparado à leitura única.

4.5 - Espectometria de Fluorescência de Raios X

A Fluorescência de raios X baseia-se em incidir um feixe de raios X em uma amostra e produzir radiações fluorescentes (transições eletrônicas dos elétrons das camadas mais internas dos átomos), que são específicas para cada elemento químico. Tais radiações são difratadas por um cristal analisador e captadas por um detector (Scapin, 2003).

Esta técnica é aplicada para a determinação qualitativa e quantitativa de maiores e menores constituintes e traços em diversos tipos de materiais.

Foi realizada a fluorescência de raios X em amostras de referência de ambos os grupos para realizar a validação das análises obtidas através do EDS, correlacionando os dados obtidos em ambos os testes. Foi utilizado o equipamento Rigaku RIX 3000 (Japão) (Figura 6) do Laboratório de Fluorescência de Raios X do CLA – IPEN – USP. Este equipamento conta com fontes radioativas emissoras de raios X, que geram um efeito fotoelétrico adequado para indução de transições eletrônicas nos níveis internos dos átomos dos cristais de hidroxiapatita e, conseqüentemente, emissão de raios X que foram captados para caracterização das amostras, podendo ser analisados considerando a quantidade de cada elemento presente na amostra.

As amostras foram colocadas sobre suportes de ácido bórico e cobertas com filme de polipropileno de 5 μm de espessura (Spex, EUA) e levadas ao espectrômetro de raios X para análise quantitativa e qualitativa.

Foi obtida a taxa de contagem dos elementos P (2,013 keV) e Ca (3,691 keV) (cps/eV) por meio de MEV/EDS, realizada em quatro pontos distintos, com uma área de 20 μm por 100s para cada amostra, totalizando um conjunto de 96 medições.

Figura 6 – Espectrômetro de Fluorescência de Raios X Rigaku RIX 3000



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Interrelação e Validação EDS x Fluorescência de Raios X

Os dados obtidos pela análise por Fluorescência de Raios X foram correlacionados aos dados obtidos pela análise por EDS. Para tal, foi utilizada a taxa de contagem dos elementos P (2,013 keV) e Ca (3,691 keV) (cps/eV) fornecida por meio de MEV/EDS.

Os teores de Ca e P de uma amostra de referência aleatória (%RS) (amostra 22) determinados por espectroscopia de Fluorescência de Raios X (Scapin et al., 2015) foram relacionados matematicamente à taxa de contagem obtida por MEV/EDS, através da seguinte equação para quantificar Ca e P (%US):

$$\%RS/(\text{cps/ev RS}) = \%US/(\text{cps/ev amostras})$$

Em que %RS = conteúdo percentual da amostra de referência; cps/ev RS = taxa de contagem da amostra de referência; cps/ev amostras = taxa de contagem das amostras; e %US = conteúdo percentual determinado da amostra desconhecida.

Em seguida, foi realizada a validação dos resultados obtidos verificando matematicamente a aceitabilidade da **precisão** e da **exatidão**, através da equação de Horwitz e do teste Z-score, respectivamente. Tais testes são sugeridos através do documento de orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2018). Ele tem como objetivo auxiliar os laboratórios de ensaio a demonstrar que um método analítico, nas condições praticadas, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a confiabilidade necessária.

Em trabalhos e análises em que não há métodos com os quais possam ser comparadas as características de precisão, valores teóricos de repetitividade e reprodutibilidade podem ser calculados a partir da equação de Horwitz. A forma mais adequada é o uso dos valores da HORRAT (*Horwitz Ratio*) para avaliar a aceitabilidade das características de precisão de um método (INMETRO, 2018).

O valor de HORRAT é dado por:

$$HO_R = RSD\%_{\text{experimental}}/RSD\%_{\text{Horwitz}}$$

Assim, HO_R , o valor HORRAT para reprodutibilidade, é o valor do desvio padrão relativo da reprodutibilidade, dividido pelo valor do desvio padrão relativo da reprodutibilidade calculado a partir da equação de Horwitz, na concentração de interesse. Se os valores de HO_R forem menores ou iguais a 2, os valores da reprodutibilidade e de precisão dos métodos podem ser considerados satisfatórios.

Para utilização do valor de Horwitz na equação ($RSD\%_{\text{Horwitz}}$), este é derivado da equação de Horwitz, que estabelece para qualquer método:

$$DPR_R = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

Este valor independe da matriz/material analisado.

O teste Z-score comparou o valor determinado em laboratório com o valor certificado por uma amostra de referência, considerando a incerteza dos valores obtidos pelas técnicas laboratoriais.

$$Z = (X_{Lab} - X_{CRM}) / \sqrt{(U_{Lab}^2 + U_{CRM}^2)}$$

Onde, Z é o valor de teste, X_{Lab} é a média experimental dos elementos obtida das amostras de dentina utilizadas neste trabalho; X_{CRM} é o valor elementar verdadeiro do material a ser analisado e correlacionado, obtido através de valores de referência; U_{Lab}^2 é a variância experimental que pode ocasionar durante a análise pelo aparelho; e U_{CRM}^2 é a variância obtida para o CRM.

Os valores de referência foram obtidos a partir do padrão NIST 1400. Este padrão é uma amostra de referência de cinzas de osso humano (*bone ash*) utilizado para correlações em análises elementares de tecidos mineralizados, tais como de dentina humana, em que é possível obter o valor verdadeiro dos elementos constituintes para realizar comparações e correlações com outras amostras e técnicas de análise (NIST, 2021).

A avaliação de exatidão é feita com o seguinte critério de decisão, de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17043 (INMETRO, 2018):

$|z| \leq 2$ = resultado satisfatório;

$2 < |z| < 3$ = resultado questionável;

$|z| \geq 3$ = resultado insatisfatório.

5 RESULTADO

5.1 - Microdureza de Superfície (MDS)

Os resultados da análise por Microdureza de Superfície estão ilustrados nos quadros 1 (Controle) e 2 (Experimental). Foi realizada uma média *baseline* dos valores de microdureza de superfície do grupo controle (53,83) e aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk em que o valor de p foi de 0,956 para o grupo controle e 0,974 para o grupo experimental, ambos com $p > 0,05$, configurando distribuição normal.

Foi realizado teste de correlação de Pearson entre a média *baseline* do grupo controle e a variação de porcentagem de dureza superficial (%VDS), com valor de coeficiente de correlação (R) de 0,042, o que demonstra não haver correlação significativa ($p = 0,845$), indicando que as amostras podem ser consideradas estatisticamente independentes.

Quadro 1 - Quadro representativo dos valores, médias e desvio padrão de microdureza (KHN) por amostra do grupo controle

AMOSTRA	50	100	150	200	300	400	500	1000	1500	2000	2500	MA	DP
1	39,9	43,2	54,6	50,0	51,4	48,3	45,1	51,4	55,6	55,6	52,0	49,74	4,92
2	30,6	29,1	28,0	37,2	53,9	57,3	62,2	62,6	45,4	34,4	33,9	43,15	12,95
3	37,2	36,5	35,9	28,1	27,1	22,5	25,1	25,6	28,3	32,5	36,5	30,48	5,13
4	40,3	34,7	38,3	33,0	29,7	30,9	27,2	25,6	29,7	31,5	32,2	32,10	4,19
5	41,9	54,6	62,2	64,7	60,3	55,9	57,7	56,6	55,6	55,3	54,9	56,34	5,54
6	28,3	31,6	47,2	53,9	66,5	71,1	68,7	65,6	65,6	53,9	52,7	55,01	13,92
7	42,1	39,1	50,0	53,1	63,0	62,2	59,5	65,6	58,4	58,8	56,6	55,31	8,11
8	43,7	43,7	53,0	56,3	54,6	63,9	66,9	60,7	63,0	54,9	51,4	55,65	7,30
9	44,9	58,0	67,3	74,7	69,7	73,1	73,6	63,5	61,8	66,9	53,6	64,28	8,81
10	48,3	59,9	63,0	79,7	77,9	73,1	78,5	77,4	78,5	69,7	61,4	69,76	9,82
11	37,6	29,9	29,0	29,8	40,6	48,8	53,0	44,9	58,0	53,0	50,5	43,19	9,98
12	69,2	71,1	64,3	67,8	72,1	66,9	69,2	69,2	63,9	54,9	58,0	66,05	5,16
13	28,3	32,2	30,3	28,3	28,1	41,9	58,4	69,7	72,1	71,6	58,8	47,25	18,09
14	83,3	82,7	73,1	73,6	71,6	69,7	79,1	82,7	70,6	61,0	68,3	74,15	6,75
15	42,1	36,3	43,5	47,2	59,1	66,9	64,7	64,7	70,1	61,4	70,1	56,92	11,73
16	37,2	30,3	32,6	41,2	54,9	57,0	64,7	59,5	67,3	61,4	48,8	50,45	12,58
17	57,7	68,3	59,5	63,5	61,4	69,7	68,3	72,1	70,1	63,9	62,6	65,19	4,53
18	36,6	38,1	35,6	36,6	37,2	38,7	36,3	59,1	53,0	62,6	53,3	44,28	9,95
19	57,0	63,0	71,6	71,1	75,2	71,6	74,2	72,1	70,1	69,2	66,9	69,27	5,03
20	36,3	23,5	26,0	27,7	26,8	28,8	26,0	25,2	23,6	21,5	19,9	25,94	4,13
21	51,4	57,7	61,4	66	63,5	65,1	66,0	66,9	52,4	66,9	73,6	62,81	6,34
22	46,7	55,6	66,0	63,9	72,1	65,6	66,0	65,1	67,3	67,3	70,6	64,20	6,82
23	60,7	54,3	57,0	54,6	52,7	48,5	52,0	45,4	39,5	47,7	48,3	50,97	5,61
24	54,9	60,3	59,1	69,2	64,7	60,3	57,7	58,4	55,3	61,8	53,9	59,60	4,29
MPP	45,7	47,2	50,4	53,0	55,6	56,6	58,3	58,7	57,3	55,7	53,7	53,83	

Legenda: (MA): Média amostral. (DP): Desvio padrão. (MPP): Média por profundidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2 - Quadro representativo dos valores, médias e desvio padrão de microdurezadureza (KHN) por amostra do grupo experimental

AMOSTRA	50	100	150	200	300	400	500	1000	1500	2000	2500	MA	DP
1	43,2	47,7	45,1	56,6	43,2	53,9	53,3	52,7	52,4	63,9	68,7	52,79	7,76
2	48,8	57,3	56,3	62,6	58,4	60,3	59,9	51,1	43,7	61,4	51,7	55,42	16,91
3	30,3	39,7	40,1	43,9	48,3	45,9	45,1	46,4	43,2	56,3	42,8	43,82	6,06
4	40,6	45,4	46,7	51,7	49,7	52,0	52,4	52,4	48,5	45,1	44,4	48,08	3,77
5	27,2	35,9	44,6	46,9	49,7	51,1	52,0	33,4	57,0	42,1	33,7	43,05	8,97
6	31,6	43,9	51,1	50,2	46,7	44,9	43,5	30,3	27,5	45,4	37,8	41,17	7,77
7	27,8	36,6	34,6	45,9	52,4	52,0	48,8	35,1	30,3	48,0	38,3	40,89	8,40
8	34,7	50,2	47,7	50,5	53,0	58,0	58,0	51,1	54,3	51,1	61,8	51,85	6,74
9	45,6	62,2	58,8	66,5	66,5	70,6	68,3	35,8	30,9	43,2	32,2	52,78	14,75
10	52,4	49,1	58,0	58,0	55,6	54,9	51,4	44,9	48,3	45,1	61,8	52,68	5,27
11	47,5	53,3	58,8	57,7	65,6	60,7	64,3	59,1	46,1	55,3	47,5	55,99	6,42
12	35,6	51,1	56,3	58,4	59,9	53,0	57,0	53,9	55,3	52,4	45,4	52,57	6,55
13	47,7	56,4	61,0	62,2	67,3	58,8	53,6	55,3	45,4	43,5	45,6	54,25	7,49
14	32,6	32,8	31,6	34,7	38,5	51,4	57,7	66,9	59,9	63,9	61,8	48,35	13,65
15	36,8	30,5	24,0	31,3	46,4	59,9	59,5	58,8	57,3	50,5	42,8	45,25	12,49
16	33,1	51,1	58,0	64,7	69,7	66,9	61,8	57,3	60,7	64,7	38,7	56,97	11,11
17	57,0	62,6	65,1	70,6	73,1	72,1	71,6	74,2	74,2	70,6	75,2	69,66	5,45
18	46,1	35,9	31,3	25,5	23,4	22,5	23,8	21,9	22,8	20,1	21,1	26,76	7,59
19	24,9	21,9	24,2	23,4	19,8	29,4	38,4	58,4	61,0	55,9	33,3	35,51	14,95
20	62,6	67,3	67,8	66,0	69,7	74,2	69,2	68,3	76,8	59,5	61,8	67,56	4,89
21	43,5	58,4	55,6	64,3	71,1	76,3	70,6	59,9	69,2	49,7	57,0	61,42	9,49
22	24,2	26,3	36,3	57,3	60,3	67,3	67,8	77,9	60,7	67,3	62,2	55,24	17,14
23	25,2	21,4	30,5	26,5	23,2	21,6	32,3	54,3	37,2	33,7	51,7	32,51	10,83
24	25,5	25,2	24,5	26,0	30,3	31,5	31,3	36,3	35,1	49,7	68,3	34,88	12,62
MPP	38,5	44,3	46,2	50,1	51,7	53,7	53,8	51,5	49,9	51,6	49,4	49,14	

Legenda: (MA): Média amostral. (DP): Desvio padrão. (MPP): Média por profundidade.

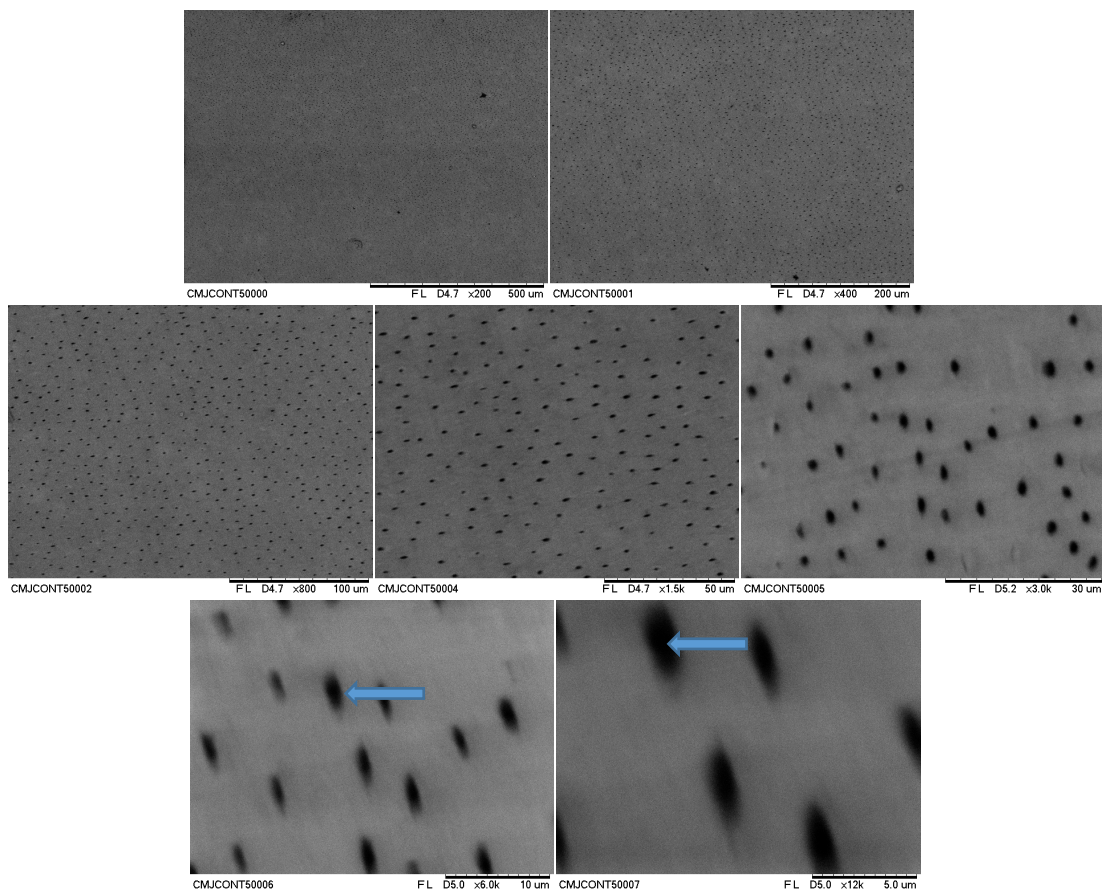
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As figuras 7 e 8 são referentes à uma amostra modelo do grupo controle e experimental (respectivamente) analisadas nos diferentes aumentos propostos. Em análise qualitativa, no grupo experimental foram

encontradas diferenças visuais ao redor dos túbulos dentinários, em regiões mais mineralizadas referentes à dentina peritubular, com halos mais radiopacos e presença de trincas nestas regiões. Também foi encontrada presença de conteúdo no interior de determinados túbulos do grupo experimental, e diferença visual mais perceptível entre dentina inter e peritubular.

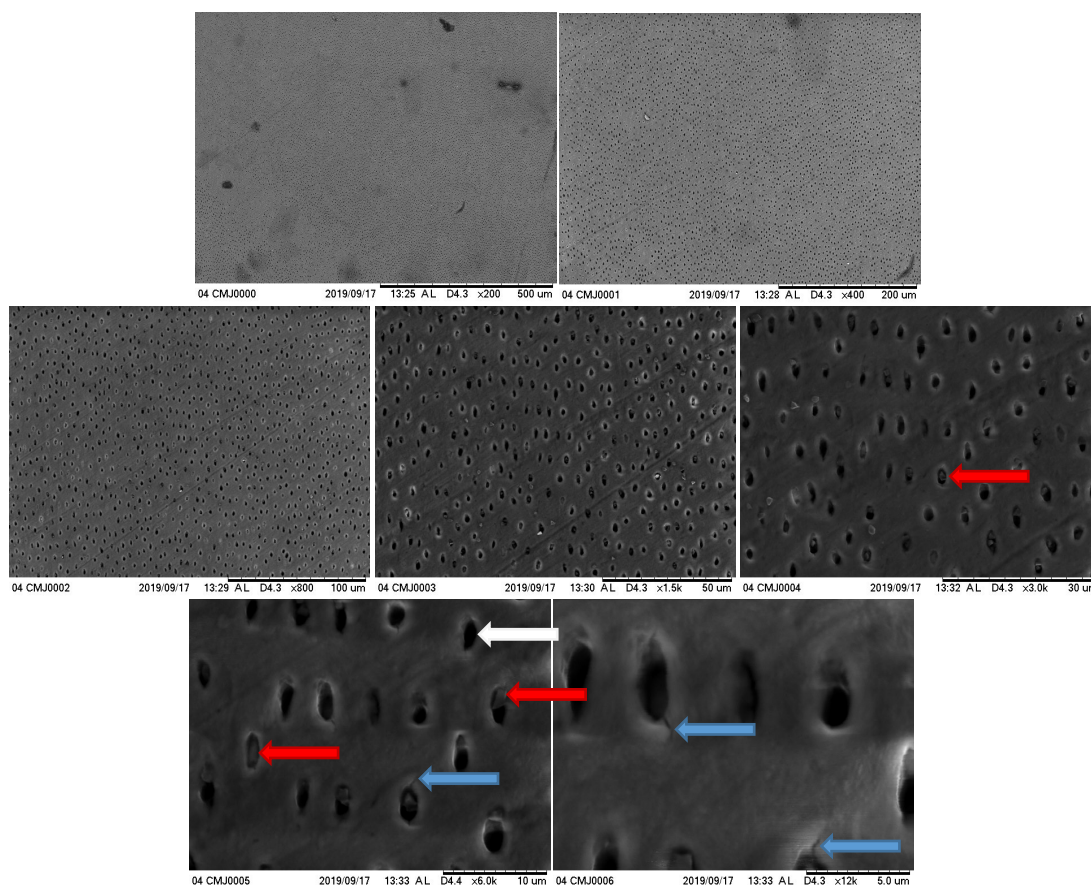
Figura 7 – Análise por MEV nos aumentos de 200x, 400x, 800x, 1500x, 3000x, 6000x e 12000x de uma amostra do grupo controle



Legenda: as setas indicam as aberturas tubulares sem a presença de *smear layer* (setas azuis), ausência de sinais de trincas na matriz ou embocadura dos túbulos e pouca diferença perceptível entre a matriz peri e inter-tubular.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Análise por MEV nos aumentos de 200x, 400x, 800x, 1500x, 3000x, 6000x e 12000x de uma amostra do grupo experimental



Legenda: as setas brancas indicam aberturas tubulares sem a presença de *smear layer*, presença de sinais de trincas na matriz peritubular (setas azuis) e diferença perceptível entre a matriz peri e inter-tubular por imagem mais densa; túbulos com conteúdo no seu interior (setas vermelhas).
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 - Espectroscopia por Energia de Difração de Raios X (EDS)

Os resultados da análise elementar por EDS das porcentagens de massa dos elementos Ca e P estão ilustrados no quadro 3, e valores percentuais de massa de cada elemento em uma amostra exemplo de cada grupo, analisados pelo *software* Quantax, estão demonstrados nas figuras 9 e 10. Foram realizadas médias *baseline* dos valores de EDS de Ca e P nas

amostras de grupo controle ($70,68 \pm 8,33$ e $11,49 \pm 1,58$, respectivamente) e experimental ($29,48 \pm 2,12$ e $12,39 \pm 1,21$, respectivamente), apresentados no quadro 4.

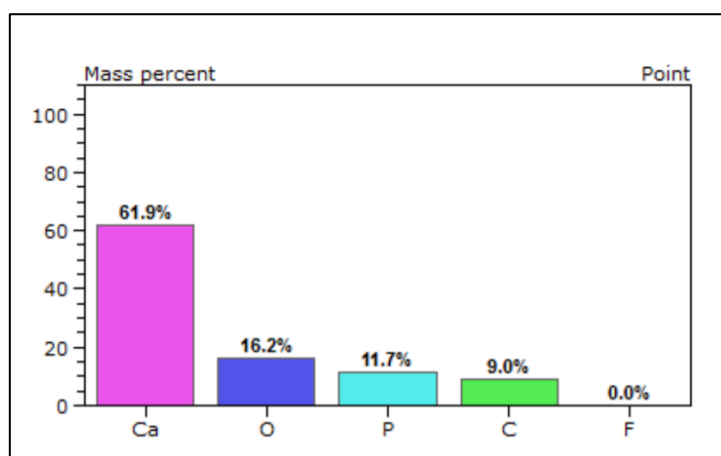
Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk apresentando distribuição normal. Foi aplicado o teste T de Student para grupos independentes em que Ca obteve valor $p = 0,000$ e P obteve valor $p = 0,037$, apresentados no quadro 4, demonstrando que existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e irradiado, com os teores de Ca menores no grupo experimental comparado ao grupo controle, e os teores de P maiores no grupo experimental comparado ao grupo controle.

Quadro 3 - Quadro representativo dos valores de análise elementar por EDS das porcentagens de massa dos elementos Ca e P para os grupos controle e experimental

Controle		Experimental	
%Ca	%P	%Ca	%P
61,9	11,7	29,8	12,9
66,4	8,9	29,4	12,3
63,0	11,0	29,5	11,3
70,3	11,3	31,4	14,8
65,7	13,5	29,6	13,8
65,9	12,5	27,7	11,6
66,0	9,9	26,6	10,3
67,4	8,1	27,3	13,2
65,9	9,6	26,0	12,0
69,2	10,9	33,2	11,6
75,4	11,8	31,9	13,1
63,6	11,2	30,6	13,1
82,6	13,0	27,3	11,8
78,5	12,2	31,0	12,6
60,7	10,5	27,8	11,9
85,3	13,5	32,0	13,0
70,1	11,2	30,8	13,2
61,6	10,8	29,5	11,5
73,6	12,0	30,3	12,3
86,0	14,0	29,7	13,2
85,3	13,8	28,9	12,5
		32,3	13,8
		30,4	12,8
		24,7	8,9

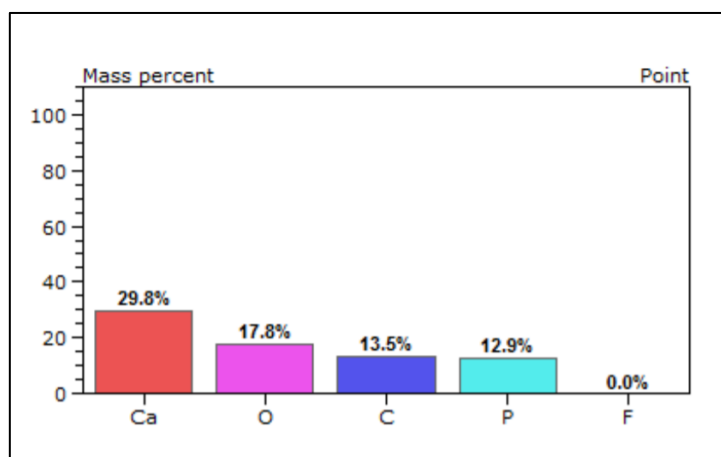
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Valores percentuais de massa de cada elemento analisado apresentado pelo *software* Quantax de uma amostra do grupo controle



Fonte: Quantax EDS.

Figura 10 – Valores percentuais de massa de cada elemento analisado apresentado pelo *software* Quantax de uma amostra do grupo experimental



Fonte: Quantax EDS.

Quadro 4 - Valores de médias e de p dos grupos analisados

	Controle	Experimental	<i>p-value</i>
Ca	70,68% (8,33)	29,48% (2,12)	0,000*
P	11,49% (1,5)	12,39% (1,21)	0,037*

Legenda: * - Indica diferença estatística entre os valores comparados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 - Interrelação e Validação EDS x Fluorescência

Os resultados dos valores de referência, valores determinados, RSD%, HOR, RE% e Z-score para a amostra de referência (RS) estão apresentados no quadro 5. A aceitabilidade calculada pelos testes utilizados (teste de HORRAT e teste Z-score) é considerada aceitável quando os valores são menores ou iguais a 2 (INMETRO, 2018).

A precisão, em termos de desvio padrão relativo (RSD%) acessado de P e Ca, foi de 2,6 e 3,2% respectivamente. Através do teste de HORRAT foi evidenciado que ambos os valores são ≤ 2 (1,3 e 1,6 para P e Ca, respectivamente), indicando que a precisão é satisfatória (INMETRO, 2018). A exatidão acessada de P e Ca, em termos de erro relativo (RE%), foi de 2,6 e 1,8%, respectivamente. A aceitabilidade, calculada pelo teste Z-score (score-score), apresentou valores entre 1,0 e 0,5 para P e CA, respectivamente, com a exatidão também considerada satisfatória (INMETRO, 2018).

Quadro 5 - Valores de referência, valores determinados, RSD%, HO_r, RE% e Z-score

Elementos	Vref±	Vdet±	RSD(%)	HO _r	RE(%)	Z-score
P	15,0±0,1	14,6±0,4	2,6	1,3	2,6	1,0
Ca	46,2±0,3	47±2	3,2	1,6	1,8	0,5

Legenda: Vref±: valores de referência de uma amostra NIST 1400; Vdet±: valores determinados pelas amostras testadas; RSD%: desvio padrão relativo da análise; HO_r: valor de aceitabilidade calculado pelo teste de HORRAT; RE%: erro relativo do teste realizado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Os efeitos diretos da radiação ionizante sobre a dentição em seres humanos ainda é um tema complexo e contraditório. Estudos conduzidos principalmente “*in vitro*” indicaram que a radioterapia pode exercer efeitos diretos sobre a estrutura dentária, incluindo alterações na microdureza e/ou alterações nas estruturas micro-morfológicas e químicas do esmalte e dentina (Deng et al., 2015, Kudkuli et al., 2020); porém ainda não há um consenso geral dentre estes trabalhos, e entre os estudos que utilizam dentes extraídos de pacientes que passaram por radioterapia “*in vivo*” (amostras consideradas “*in vivo*”).

Metodologias utilizando dentes de pacientes que passaram por terapia de radiação ionizante são raras, considerando a complexidade biológica e ética de se obtê-los para estudo. Geralmente, a obtenção só é viável em grandes centros terapêuticos, envolvendo equipes médicas que atuam em multidisciplinaridade nas áreas de oncologia e odontologia. A contra-indicação geral de não se realizar procedimentos cirúrgicos em tais pacientes, pelo risco de osteoradionecrose, muitas vezes inviabiliza a realização de trabalhos, exceto em situações muito específicas em que há, de fato, uma indicação urgente de extrações em pacientes irradiados.

O presente estudo se destaca pela importante contribuição ao entendimento dos reais efeitos clínicos da irradiação “*in vivo*”, uma vez que são amostras de dentina de dentes irradiados durante o tratamento radioterápico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço que foram obtidas por motivos de exodontia em caráter de urgência. Desta forma, apesar das análises realizadas terem sido laboratoriais (*in vitro*), a radiação ionizante terapêutica, que é a variável principal entre grupos, foi realizada localmente, no próprio ambiente oral.

A literatura evidencia que um dos principais pontos de controvérsia é se o fato da radiação proporcionar por si mudanças significativas na morfologia dos tecidos duros circunjacentes, ou se a susceptibilidade dos tecidos estaria na dependência de efeitos colaterais da radiação, como: xerostomia, alterações na microbiota, dieta e resistência do hospedeiro agora imunodeprimido (Lieshout, Bots, 2014).

Rodrigues et al. (2018), em estudo *in vitro*, demonstraram haver alterações na microdureza da dentina irradiada, com valores maiores no grupo irradiado comparados aos do grupo controle. Eles explicam e relacionam esses valores por conta de mudanças que acontecem na matriz orgânica, ao qual tem maior presença de água em sua composição, e a possível formação de radicais livres nesse meio. A radioterapia provocaria uma descarboxilação dos elos laterais do carboxilato do colágeno, ligação responsável pela interação da matriz orgânica com os cristais de hidroxiapatita, tornando-a mais suscetível à hidrólise e desmineralização. Eles também relacionam tudo isso com análise por FTIR, que mostraram um aumento de 20% na área da banda de conteúdo mineral (fosfato) da dentina dos grupos irradiados, sugerindo que a radioterapia foi de alguma forma capaz de alterar as ligações químicas para que houvesse reorganização da estrutura da hidroxiapatita.

No entanto, estudo mais recente de Kudkuli et al. (2020) em que foi realizado teste de microdureza e microtomografia de radiação síncrotron de raios X (SR μ CT) em esmalte e dentina irradiada *in vitro*, foi demonstrado diminuição na microdureza, mas aumento na densidade mineral do esmalte. Tais alterações foram dependentes das doses de radiação, apresentando desmineralização gradual a partir do aumento da radiação.

Em sua discussão, Kudkuli et al. (2020) também salienta a complexidade e controvérsias geradas a partir da técnica de análise de microdureza para o entendimento das alterações nos tecidos mineralizados.

Eles alegam que diversos estudos demonstraram haver aumento na microdureza de superfície, tais como de Rodrigues et al. (2018), e que isto estaria associado diretamente com a alteração provocada na porção orgânica. Ao ocorrer descarboxilação do conteúdo orgânico, o padrão dos prismas de esmalte pode ser alterado, tornando-o mais friável, sendo mais rígido, porém quebradiço e suscetível ao processo de delaminação comumente visto na clínica (Soares et al., 2010; Gonçalves et al., 2014; Lieshout, Bots, 2014; Reed et al., 2015). Este processo pode induzir microfissuras e trincas em minerais de hidroxiapatita, o que tornaria o tecido mais suscetível à falha (Hübner et al., 2005; Kielbassa et al., 2006).

No entanto, no presente estudo não foram encontradas diferenças significativas entre os valores médios de microdureza superficial entre ambos os grupos, aceitando a hipótese (H01) de que a dentina submetida ao tratamento de radioterapia não apresenta alterações na microdureza superficial quando comparada à dentina saudável. Isto pode estar relacionado ao fato dos remanescentes dentais utilizados para análise não terem sofrido alterações significativas o suficiente na porção orgânica para serem passíveis de detecção em um teste puramente mecânico, considerando a sensibilidade da técnica (Kudkuli et al., 2020). Entretanto, quando observados os valores de microdureza na porção mais superficial da dentina (50µm), houve valores menores que em regiões mais profundas.

A realização do teste em toda a extensão das amostras permitiu verificar o grau de microdureza dos diferentes níveis de dentina, seja ela próxima da polpa, em uma região intermediária ou próximo a junção dentina-esmalte ou dentina-cimento. Considerando a correlação inversa entre microdureza e densidade tubular na dentina conforme o estudo de Pashley et al. (1985), os resultados de microdureza deste estudo não corroboraram os achados dos autores para o grupo experimental, onde de acordo com o Quadro 2, observam-se maiores valores médios de microdureza na dentina

profunda (49,4) do que na superficial (38,52) (Pashley et al., 1985; Naseri et al., 2019). Isto pode demonstrar que, apesar de não haver diferença significativa nos valores médios de microdureza comparada entre grupos, a queda na dureza em regiões à 50 μ m demonstra que a radiação pode ter afetado a dentina em algum nível.

Na MEV foram encontradas diferenças na conformação e estrutura da dentina e embocadura dos túbulos dentinários, onde a dentina peritubular mostrou-se mais evidente no grupo experimental e trincas (*microcracks*) podem ser vistos nestas regiões, o que pode corroborar com os resultados de microdureza, contrapondo-se à densidade tubular. Rodrigues et al. (2018) também observaram diferenças visuais, no entanto, com túbulos mais constritos e estreitos, que poderia representar a capacidade da radiação em provocar uma alteração no tecido (uma provável desmineralização, com subsequente remineralização natural), ocasionando sua parcial obliteração e alteração dos valores de microdureza, considerando a reestruturação da quantidade de dentina inter e peritubular. Conteúdo intra-tubular também puderam ser observados na MEV do presente estudo para o grupo experimental irradiado.

Tais achados corroboram com Rodrigues et al. (2018) ao sugerirem ser possível visualizar nas imagens de MEV alterações entre a dentina inter e peritubular, que se apresentaram com morfologia contendo pontos de destruição e quebra entre os dois tecidos. Eles puderam observar uma morfologia homogênea entre a dentina inter e peritubular, com perda de continuidade entre essas duas estruturas, associadas à reorganização da estrutura do colágeno citada anteriormente. Essa alteração comprometeria suas propriedades mecânicas e adesivas da dentina, tendo um tecido com padrões minerais e de microdureza diferenciados, mas não necessariamente positivos.

Esta observação nos levou à reflexão de que provavelmente o tecido irradiado poderia apresentar maior conteúdo mineral. No entanto, foi detectada redução significativa entre os valores quantitativos de teor de Ca nas amostras controle comparadas às amostras irradiadas (61.9% para 29.8%, respectivamente), e aumento significativo entre os valores quantitativos de teor de P nas amostras controle comparadas às amostras irradiadas (11,49% para 12,39%, respectivamente), rejeitando a hipótese de que a dentina humana submetida a radioterapia não apresentaria variação na composição química (H02). Isso pode ser explicado pelo fato do íon Ca ser, possivelmente, um dos primeiros a se dissociar na molécula de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) quando ocorre alguma alteração química, como em casos de desmineralização, e este processo ser capaz de alterar a proporção Ca/P da molécula. Da mesma forma, Rodrigues et al. (2018) também encontraram esse aumento no teor de P por análise de FTIR, mas sem saberem exatamente a razão disso.

Durante o processo de dissociação da molécula de hidroxiapatita, o radical hidroxila (OH) tende a se unir com prótons H^+ do meio formando água; meio este que tende a possuir uma quantidade maior de radicais livres considerando o processo de radiólise da água promovido pela radiação ionizante em tecidos orgânicos. Tal processo tende a aumentar o pH do meio, acarretando em outras mudanças químicas, e tendo em seguida a dissociação do Ca da molécula.

Esta queda da quantidade de Ca demonstra que a irradiação ionizante pode gerar uma diminuição de íons minerais, promovendo de fato ou, ao menos, criando um meio mais propenso à desmineralização, através da quebra da molécula de hidroxiapatita. Sendo assim, esta mudança presente no íon Ca pode estar relacionada com o fato de uma terapia ionizante em pacientes com câncer de cabeça e pescoço ser realizada de forma fracionada e intercalada, em baixas doses, ao longo de um período de várias semanas, o

que condiz com a preocupação de diversos autores em realizarem trabalhos laboratoriais com esta mesma metodologia de tratamento (Rodrigues et al., 2018; Fonseca et al., 2020).

Normalmente, tratamentos radioterápicos para tumores de cabeça e pescoço são realizados em dosagens totais de 70 Gy, através de exposições aplicadas pontualmente de até 2 Gy por sessão, em períodos de 2 a 3 meses, intercalando os dias de aplicação, como no presente estudo. Estas pequenas dosagens por um longo período, e as mais diversas variáveis que podem ocorrer no ambiente bucal de um paciente durante e após o tratamento podem influenciar na capacidade dos dentes encontrarem um equilíbrio no processo de des e remineralização (Paiola et al., 2018).

Pacientes que passam por radioterapia de cabeça e pescoço demandam um acompanhamento rigoroso da condição bucal. É indicado que esses pacientes retornem para consultas periódicas para avaliações e procedimentos de prevenção, como profilaxias e aplicações tópicas de flúor (Lieshout, Bots, 2014). A cárie de radiação, por possuir um comportamento agressivo e rampante, demanda que esteja sob rigorosa supervisão, uma vez que a perda estrutural causada terá uma abordagem restauradora muitas vezes complexa e ineficiente.

Desta forma, o fato de pacientes que passaram por radioterapia serem normalmente expostos a tratamentos paliativos para prevenir o surgimento de tais lesões de cáries de radiação, tanto utilizando soluções fluoretadas recorrentes nas consultas de acompanhamento, quanto realizando restaurações com ionômero de vidro e aplicações de vernizes fluoretados, ao qual possuem a capacidade de liberar flúor ao meio, podem ter contribuído para que os dentes não sofressem desmineralização e perda de conteúdo mineral a ponto do teste de microdureza encontrar diferenças significativas; ainda que, foram modificados o suficiente para que houvesse uma queda no teor de Ca.

Isso corrobora com Reed et al. (2015), quando dizem que a realização de vários métodos experimentais com amplas diferenças na solução de armazenamento e no método de análise (como e onde as propriedades do dente foram medidas, e as variações entre pacientes) tendem a contribuir para os resultados contraditórios encontrados na literatura. Em seu estudo, Reed et al. (2015), observam diferenças significantes na proporção proteína/mineral, e no módulo de elasticidade nos espécimes de esmalte e dentina após radioterapia simulada “*in vitro*”. Os autores alegaram serem os primeiros a demonstrarem esta mudança com uma metodologia laboratorial adequada, sugerindo que a diminuição do conteúdo de proteína explicaria o aumento correspondente no módulo de elasticidade, deixando a estrutura dentária mais propensa à destruição.

No presente estudo o módulo de elasticidade não foi avaliado. No entanto, se realmente ocorre um aumento pós-irradiação, como sugerem Reed et al. (2015), explicaria a maior microdureza individual observada nas amostras irradiadas, apesar da redução de Ca. Da mesma forma, Rodrigues et al. (2018) em avaliação de microdureza Vickers e módulo de elasticidade de dentina irradiada *in vitro* também encontraram valores maiores de microdureza, porém menores de elasticidade, independente da profundidade. Eles consideram que ocorre uma alteração do arranjo microestrutural da matriz orgânica e inorgânica da dentina devido à perda de interação orgânico-mineral, o que causaria a diminuição da rigidez e, conseqüentemente, diminuindo o módulo de elasticidade.

Longitudinalmente, um tecido menos elástico pode se tornar mais quebradiço, ainda mais em um ambiente drástico com redução do fluxo salivar, menor capacidade de resposta do indivíduo debilitado, maior agressividade dos microorganismos com maior aporte de sacarose oriundos da dieta e outras variáveis associadas (Kielbassa et al., 2006), gerando processos cariosos agressivos e acelerados.

Tais achados também corroboram com análises dos mesmos autores em testes de resistência adesiva em dentes irradiados *in vitro* e restaurados em dentina com resina composta (Rodrigues et al., 2018); e em análises relacionadas a dentes irradiados *in vitro* e tratados endodonticamente com diferentes tipos de irrigações (Paiola et al., 2018), em que houve maior taxa de falha coesiva em dentina (falha com maior nível de destruição tecidual, e não no material restaurador). Considerando que o tecido orgânico se torna mais quebradiço, por menor módulo de elasticidade, sua estrutura fica enfraquecida e mais propensa à falha em testes de microtração (Reed et al., 2015).

Reed et al. (2015) também ressaltam que a redução percentual relativa da razão proteína/mineral foi muito maior nos locais da matriz orgânica do esmalte (44-77%) em comparação com os locais da dentina (4-6%). A partir daí assume-se que a delaminação causada em regiões cervicais de dentes submetidos a radioterapia, região esta que costuma se apresentar com fina camada de esmalte, tende a ocorrer por ser uma área de maior fragilidade e provável maior alteração, visto o impacto causado na estrutura do colágeno presente na junção dentina esmalte (JDE) e sua ligação, especialmente em regiões cervicais (Fonseca et al., 2020).

Dentre os possíveis fatores relacionados à brusca mudança estrutural dos tecidos duros dentais também está a alteração no funcionamento das glândulas salivares atingidas pela radiação ionizante (Lieshout, Bots, 2014). Glândulas salivares atingidas pela radiação tendem a possuírem uma queda na produção e na qualidade da saliva, com mudanças em características específicas referentes à lubrificação e manutenção das membranas mucosas (água, eletrólitos, mucina e glicoproteínas ricas em prolina), na limpeza da cavidade oral, capacidade tamponante e remineralização, ação antimicrobiana (imunoglobulina, defensinas, lisozima e mucinas), digestão

(amilase, lipase e água), gosto (água e gustin) e fonação (água e mucina) (Kielbassa et al., 2006; Deng et al., 2015).

Uma alteração direta nesses fatores, somado ao fato de pacientes irradiados serem aconselhados a terem dietas compostas de refeições frequentes durante o dia com ênfase em alimentos de alto teor calórico, poderia ser um agravante para o surgimento e desenvolvimento acelerado de lesões de cárie de radiação, uma vez que o ambiente oral estaria comprometido (Lieshout, Bots, 2014).

Considerando que os principais efeitos colaterais da radioterapia que não envolvem diretamente os tecidos duros dentais são xerostomia (Dobros et al., 2016), trismo, atrofia muscular (Beech et al., 2014), mucosite e infecções fúngicas oportunistas, normalmente causadas por conta do ambiente oral alterado (Khaw et al., 2014), fazem com que o entendimento da cárie de radiação seja algo complexo e multifatorial, bem como um processo carioso convencional, com autores associando o fato da lesão de cárie de radiação ser tão agressiva e prevalente justamente por conta de tais efeitos colaterais (Gupta et al., 2015) e, durante a realização de estudos laboratoriais, ser difícil desassociar tantas variáveis para conseguir um entendimento da doença.

Além da dificuldade metodológica intrínseca relacionada ao estudo de dentes irradiados, existe também, dentre as diferentes análises elementares de materiais orgânicos, uma dificuldade constante em se conseguir a possível correlação direta dos dados obtidos entre diferentes análises (Horwitz, 1995). Isso ocorre principalmente em amostras de tecido biológico. Um dos objetivos do presente estudo foi demonstrar uma forma de correlacionar diferentes técnicas de análise elementar e validar sua utilização com parâmetros aceitáveis de correlação, utilizando Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios X e Espectrometria de Fluorescência de Raios X.

A técnica MEV/EDS é baseada na análise do efeito fotoelétrico que permite interpretar e expressar numericamente qual elemento atômico de acordo com a camada de valência foi influenciado pela energia incidente. Existe uma excitação específica para cada elemento permitindo a análise quantitativa e qualitativa dos elementos constituintes do material estudado. Esta técnica tende a ser rápida, de fácil realização e não destrutiva, o que são pontos positivos quando se trata do manuseio e análise de materiais biológicos de difícil acesso.

Da mesma forma, a fluorescência de raios X é baseada na focalização de um feixe de raios X em uma amostra e na produção de radiações fluorescentes que são transições eletrônicas de elétrons das camadas mais internas de átomos, específicas para cada elemento químico. Sua realização costuma ser mais complexa, com análises que levam maior tempo para serem realizadas, maior rigor técnico, e maior custo por conta do aparelho em questão.

A fluorescência de raios X, sendo realizada em ambiente sem vácuo, analisa a presença de óxidos estáveis e não o conteúdo quantitativo direto do próprio elemento, o que impossibilita correlacionar diretamente o seu resultado com o da técnica MEV/EDS. Assim, teste realizado no vácuo sem a presença de oxigênio e outros elementos que possam interferir na medição não poderiam ser correlacionados diretamente com os dados obtidos através de fluorescência de raios X.

Para validações de métodos e técnicas analíticas novas, convém utilizar amostras de referências em suas correlações. O uso de materiais com propriedades ou valores de quantidade conhecidos e já referenciados na literatura e por instituições internacionais pode ser utilizado para avaliar a precisão do método, bem como obter informações sobre interferências ao aplicar algum método novo. Quando usados como parte do procedimento de medição, são conhecidos como padrões de medição. Quando colocado

periodicamente em um lote analítico, pode-se verificar se a resposta do processo analítico ao analito (material a ser estudado) é estável (NATA, 2013).

A partir da correlação realizada entre os valores de massa elementar dados pelo EDS, valores de referência utilizados por um padrão NIST, e a realização de análises por Fluorescência de Raios X, foi possível comprovar que os dados adquiridos por EDS são satisfatórios e confiáveis, com a metodologia podendo ser usada para análises quantitativas elementares em tecido dentinário, e rejeitando a hipótese H03 de não ser possível estabelecer relação entre as análises realizadas.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a dentina submetida ao tratamento de radioterapia não apresentou alterações na microdureza superficial quando comparada ao grupo controle; e que ocorre uma alteração química na proporção orgânico-mineral, com queda no teor de Ca e aumento no teor de P da dentina humana submetida ao tratamento de radioterapia quando comparados ao grupo controle.

Conclui-se também ser possível quantificar *in vitro* o Fósforo e o Cálcio na dentina humana por MEV/EDS, com parâmetros de precisão e exatidão satisfatórias para a técnica, tornando a análise por EDS uma alternativa viável para o melhor entendimento molecular de amostras.

REFERÊNCIAS*

Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2018;47(8):725–31.

Bachmann L, Zezell DM. Estrutura e composição do esmalte e da dentina - tratamento térmico e irradiação laser. São Paulo. Editora Livraria da Física, 2005. 298p. ISBN 858832539x.

Beech N, Robinson S, Porceddu S, Batstone M. Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. *Aust Dent J.* 2014;59:20–8.

Bernard C, Villat C, Abouelleil H, Gustin MP, Grosgeat B. Tensile bond strengths of two adhesives on irradiated and nonirradiated human dentin. *Biomed Res Int.* 2015, Article ID 798972.

Chronopoulos A, Zarra T, Ehrenfeld M, Otto S. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. *Int Dent J.* 2018;68(1):22–30.

Deng J, Jackson L, Epstein JB, Migliorati CA, Murphy BA. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2015;51(9):824-31.

Dobros K, Hajto-Bryk J, Wroblewska M, Zarzecka J. Radiation-induced caries as the late effect of radiation therapy in the head and neck region. *Contemp Oncol.* 2016;20(4):287–90.

Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol.* 2010;31(4):363-72.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127:2893-917.

Fonseca JM, Troconis CC, Palmier NR, Gomes-Silva W, Paglioni MD, Araújo AL, et al. The impact of head and neck radiotherapy on the dentine-

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 09 março 2020]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

enamel junction: a systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(1):e96-e105.

Galetti R, Santos-Silva AR, Antunes AN, Alves FA, Lopes MA, de Goes MF. Radiotherapy does not impair dentin adhesive properties in head and neck cancer patients. *Clin Oral Investig*. 2014;18(7):1771-8.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976;21(6):355-62.

Gomes-Silva W, Prado-Ribeiro AC, Brandão TB, Moraes-Faria K, de Castro Junior G, Mak MP, et al. Postradiation matrix metalloproteinase-20 expression and its impact on dental micromorphology and radiation-related caries. *Caries Res*. 2017;51(3):216-24.

Gomes-Silva W, Prado Ribeiro AC, de Castro Junior G, Salvajoli JV, Rangel Palmier N, Lopes MA, et al. Head and neck radiotherapy does not increase gelatinase (metalloproteinase-2 and -9) expression or activity in teeth irradiated in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017;124(2):175-82.

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;42(8):986-92.

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;6(2):160–6.

Hong CH, Napeñas JJ, Hodgson BD, Stokman MA, Mathers-Stauffer V, Elting LS, et al. A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. *Support Care Cancer*. 2010;18(8):1007-21.

Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure & Appl Chem*. 1995;67(2): 331-43.

Huang SH, O’Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(2):233–40.

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

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008. INMETRO; 2018. 28p.

Jaward H, Hodson NA, Nixon PJ. A review of dental treatment of head and neck cancer patients, before, during and after radiotherapy: part 1. *Br Dent J*. 2015;218(2):65-8.

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

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

Kitajima EW, Leite B. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura. Apostila de apoio. Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica. Piracicaba, ESALQ/USP; 1999. 46p.

Kohli K, Corns R, Vinnakota K, Steiner P, Elith C, Schellenberg D, et al. A bioimpedance analysis of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Curr Oncol*. 2018;25(3):e193–e199.

Köstler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. *CA Cancer J Clin*. 2001;51(5):290-315.

Kudkuli J, Agrawal A, Gurjar OP, Sharma SD, Rekha PD, Manzoor MAP, et al. Demineralization of tooth enamel following radiation therapy; an in vitro microstructure and microhardness analysis. *J Cancer Res Ther*. 2020;16(3):612-8.

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

Madrid Troconis CC, Santos-Silva AR, Brandão TB, Lopes MA, de Goes MF. Impact of head and neck radiotherapy on the mechanical behavior of composite resins and adhesive systems: A systematic review. *Dent Mater*. 2017;33(11):1229-43.

Maio MF. Avaliação dos efeitos da radiação ionizante em materiais utilizados em restaurações dentárias [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2009 [cited

2019 Ago 23]. Available from: doi:10.11606/D.85.2009.tde-27102009-105515

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;23(8):3351-8.

Moore C, McLister C, Cardwell C, O'Neill C, Donnelly M, McKenna G. Dental caries following radiotherapy for head and neck cancer: A systematic review. *Oral Oncol*. 2020;100:104484.

Naseri M, Eftekhari L, Gholami F, Atai M, Dianat O. The effect of calcium hydroxide and nano-calcium hydroxide on microhardness and superficial chemical structure of root canal dentin: an ex vivo study. *J Endod*. 2019;45(9):1148-54.

National Association of Testing Authorities. Technical Note 17: Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Australia: NATA; 2013.

National Institute of Standards and Technology - NIST. Standard Reference Material 1400: Bone Ash [Internet]. National Institute of Standards and Technology; 1992 [cited 2021 Apr 12] 3p. Available from: https://www.nist.gov/srmors/certificates/view_certGIF.cfm?certificate=1400

Okuno E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. *Estuda*. 2013;27(77):187-99.

Paiola FG, Lopes FC, Mazzi-Chaves JF, Pereira RD, Oliveira HF, Queiroz AM, et al. How to improve root canal filling in teeth subjected to radiation therapy for cancer. *Braz Oral Res*. 2018;32:e121.

Palmier NR, Ribeiro ACP, Fonseca JM, Salvajoli JV, Vargas PA, Lopes MA, et al. Radiation-related caries assessment through the international caries detection and assessment system and the post-radiation dental index. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017;124(6):542–7.

Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol*. 1985;1(5):176-9.

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

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;22(2):875-83.

Rose-Ped AM, Bellm LA, Epstein JB, Trotti A, Gwede C, Fuchs HJ. Complications of radiation therapy for head and neck cancers. The patient's perspective. *Cancer Nurs*. 2002;25(6):461–9.

Santos MO. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2017. 128p.

Scapin MA. Aplicação da difração e fluorescência de raios-X (WDXRF): ensaios de argilominerais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2003 [cited 2019 Ago 27]. Available from: doi:10.11606/D.85.2003.tde-07052007-161852.

Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer – surgery. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):394-401.

Silva ARS, Alves FA, Berger SB, Giannini M, Goes MF, Lopes MA. Radiation-related caries and early restoration failure in head and neck cancer patients. A polarized light microscopy and scanning electron microscopy study. *Support Care Cancer*. 2010;18(1):83–7.

Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PC, Naves LZ, et al. Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. *J Dent Res*. 2010;89(2):159–64.

Ten Cate AR. Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2013.

Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(3):199–212.

Yamin PA, Pereira RD, Lopes FC, Queiroz AM, Oliveira HF, Saquy PC, et al. Longevity of bond strength of resin cements to root dentine after radiation therapy. *Int Endod J*. 2018;51(11):1301-12.

Zamataro CB, Benetti C, Ana PA, Pereira TM, Blay A, Zezell DM. Association of fluoride and Er,Cr:YSGG laser irradiation provides enamel resistance to low pH environment. American Society for Laser Medicine and Surgery Abstracts. In: Annual Conference of the American Society for Lasers in Medicine and Surgery. Boston; 2013. [cited 2021 Apr 10]. p. 64-5. Available from: <http://repositorio.ipen.br/handle/123456789/20232>.