

**EFFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE SOBRE LAS
PROPIEDADES FÍSICO-MECÁNICAS Y CARACTERÍSTICAS
ULTRAESTRUCTURALES DEL ESMALTE**

Trabajo de investigación requisito para optar al
Título de Magíster en Ciencias Odontológicas

Alumna:

Dra. Gabriela Jerez Delgadillo
Especialista en Odontopediatría

PROFESOR GUÍA:

Dra. Iسس Luque-Martinez
Post Doctora en Odontología Restauradora

Agradecimientos.

Este trabajo no habría sido posible de concluir sin mi docente guía, Dra. Issis Luque-Martínez, por su dedicación, paciencia y gran calidad humana a lo largo de todo mi desarrollo académico.

Al Dr. Miguel Muñoz por su apoyo, ayuda incondicional, y disposición durante toda mi formación en este magíster.

Al Dr. Michael Wlender por dedicar su tiempo y entregar sus conocimientos para el desarrollo de esta investigación.

Finalmente al equipo de físicos médicos de la Unidad de Oncología del Hospital Carlos Van Buren por su excelente disposición y ayuda durante todo este tiempo.

Dedicatoria.

A mi familia y amigos.

Índice

1	Introducción	1-2
2	Marco teórico	3
2.1	Cáncer Oral	3
	2.1.1 Radioterapia	3-5
	2.1.2 Efectos colaterales de la radiación sobre tejidos orales	5-6
	2.1.2.1 Glándulas salivales irradiadas.	6-7
	2.1.3 Efectos colaterales de la radiación sobre tejidos duros dentales.	8
	2.1.3.1 Esmalte irradiado.	8
	2.1.3.2 Dentina irradiada.	8-9
	2.1.3.3 Caries de la radiación.	9-11
	2.1.4 Microbioma y radiación.	11
3.1	Histología Dental.	12
	3.1.1 Esmalte Dental.	12-15
	3.1.2 Unión amelodentinaria (UAD).	15-18
	3.1.3 Dentina.	18-20
4	Pregunta de Investigación.	21
5	Hipótesis de trabajo	21
5.1	Hipótesis de investigación	21
6	Objetivo General.	22
6.1	Objetivos específicos.	22
7	Materiales y métodos	23
7.1	Tipo de estudio.	23
7.2	Tipo de muestra.	23
7.3	Selección de la muestra.	23-24
7.4	Criterios de inclusión y exclusión	25
7.5	Variables.	26
	7.5.1 Variables Independientes.	26
	7.5.2 Variables Dependientes.	27
7.6	Métodos.	28
	7.6.1 Tenacidad a la fractura (K_{Ic}).	28
	7.6.2 Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR).	28-30
7.7	Pertinencia de la técnica.	30-31
7.8	Control de sesgos y limitaciones.	31
7.9	Consideraciones de bioseguridad.	31
7.10	Materiales.	32
7.11	Preparación de la muestra	33
	7.11.1 Test de Tenacidad a la fractura (K_{Ic})	33-37
	7.11.2 Test de Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR).	37-38
	7.11.3 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB).	39
7.12	Proceso de irradiación.	39

7.13	Análisis estadístico.	40
8	Resultados.	41-45
9	Discusión.	46-50
10	Conclusión.	51
11	Referencias.	52-68

Resumen

TÍTULO: "EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-MECÁNICAS Y CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DEL ESMALTE".

La radioterapia es uno de los tratamientos de elección para el cáncer de cabeza y cuello, debido a su alta efectividad. Su objetivo principal es lograr el control local del tumor, sin embargo genera secuelas en los tejidos adyacentes a él. Lo anterior incluye el daño a los tejidos duros dentarios (esmalte/dentina), tanto en sus componentes mineral como orgánico, siendo así más susceptibles al desarrollo de lesiones cariosas y no cariosas asociadas a la radiación. Existen controversias en el efecto de la radiación sobre el avance de lesiones no cariosas asociadas a los componentes mineral y orgánico (proteínas colagénicas y no colagénicas) del esmalte y dentina, siendo desconocido aun las consecuencias sobre, la unión amelodentinaria(UAD), donde el contenido orgánico podría ser más susceptible, lo que podría afectar su capacidad para evitar la propagación de grietas y resistencia a la fractura. Así, el efecto de la radiación ionizante(RI) sobre la UAD y su repercusión en la integridad biomecánica de dicha interfase conformada por esmalte y dentina, necesita ser esclarecido. Debido a esto, este estudio evaluó la influencia de la RI sobre las propiedades físico-mecánicas (tenacidad a la fractura) y características ultra-estructurales del esmalte-UAD en comparación al tejido sano. Para ello, un total de 12 terceros molares sanos, fueron divididos en 4 grupos (n=6) según: dosis de radiación (0 Gy/70 Gy); y dirección de los prismas de esmalte (paralelo/ oblicuo). Se sometieron a test de tenacidad a la fractura (K_{Ic}) en una máquina de ensayo universal (0,1 mm/min) hasta punto de fractura. Para el análisis ultra-estructural, se analizó los cambios en el contenido orgánico de la UAD a través de espectroscopia ATR-FTIR en dientes desmineralizados (n=3). Los datos de K_{Ic} se analizaron con ANOVA de dos vías y *post hoc* Test de Tukey ($\alpha=0,05$). Los datos de ATR-FTIR se analizaron con prueba U de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). Se realizó una valoración cualitativa de la morfología por Microscopía electrónica de barrido(MEB). Se pudo observar que, el comportamiento mecánico del esmalte-UAD se ve afectado por la radiación ionizante ($p=0,035$). El tejido ofrece menor tenacidad al avance de la grieta cuando los primas se encuentran paralelos a este, en comparación a la disposición oblicua ($p=0,001$). Esta disposición ofrece menor variabilidad en la K_c , independiente de la radiación ionizante ($p>0,05$). El esmalte-UAD sufre un cambio morfológico posterior a la RI valorado por MEB. Existe reducción del pico 2691 cm^{-1} y aumento del rango $2660\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ relacionados a fosfolípidos en análisis por espectroscopia ATR-FTIR. Es posible concluir que, la RI genera alteraciones estructurales en el esmalte-UAD tanto en su contenido mineral como orgánico, sufriendo fragmentación lipídica en este último. Provocando una disminución en su desempeño físico-mecánico frente al avance de grietas, es decir, en la tenacidad a la fractura del tejido dentario.

Palabras llaves: "Efecto de radiación"; "Unión amelodentinaria"; Esmalte; Delaminación.

Introducción

La radioterapia es uno de los tratamientos de elección para el cáncer de cabeza y cuello(1), debido a su alta efectividad dentro de las opciones terapéuticas(2), empleándose como tratamiento primario o como adyuvante de la cirugía(3). Tiene como objetivo principal lograr el control local del tumor, sin embargo, genera secuelas en los tejidos adyacentes al tumor(4), como los tejidos duros del diente (esmalte/dentina). Lo anterior, se genera por la acción directa de la radiación ionizante sobre el ADN (rupturas de la doble cadena), y las estructuras de los organelos celulares, entre otros(5, 6); o de manera indirecta, producto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno (RNS) (7) que conlleva a la ionización o excitación de los componentes moleculares del agua, lípidos y particularmente al contenido orgánico – colágeno y no colágeno-(8) presente en los tejidos (7).

Se ha observado que la radiación ionizante afecta las estructuras minerales y orgánicas (proteínas colágenas y no colágenas) del esmalte y la dentina(9, 10), lo que podría hacerlas más susceptibles al desarrollo de lesiones cariosas(11, 12). Clínicamente se ven afectados sitios del diente poco comunes en lesiones cariosas habituales, como superficies lisas o cúspides, donde histológicamente el área más afectada es la unión amelodentinaria (UAD)(12-15). La pérdida de capas de esmalte por delaminación, descrita por algunos autores(15-17) como co-adyuvante al avance de estas lesiones, podría estar relacionada con los efectos de la radiación sobre la UAD, lo que propiciaría la exposición de tejido dentinario al medio, haciéndolo más vulnerable a la degradación(18).

En la UAD subyace la transición e interacción entre dos tejidos histomorfológicamente diferentes(19); en dicha zona el contenido mineral se distribuye en mayor proporción próximo al esmalte, y decrece en la medida que se aproxima al tejido dentinario. En tanto el contenido orgánico se localiza de manera inversa(19, 20), otorgándole así la capacidad de restringir la propagación de grietas bajo carga

masticatoria(21). Esto además reduce las concentraciones de estrés y actúa como mecanismo de endurecimiento entre tejidos mecánica y estructuralmente diferentes(22). Sin embargo, aún existe controversia de los efectos generados por la radiación en esta unión y los tejidos involucrados (23, 24), donde el contenido orgánico puede ser más susceptible(24-26). La radiación ha mostrado generar una drástica disminución en la microdureza superficial del esmalte(10), así como daños en las estructuras prismáticas(11, 27, 28), pérdida en su organización(25) y reducción de sus propiedades mecánicas(29). No obstante, el efecto directo de la radiación ionizante sobre el contenido orgánico y mineral involucrado en la UAD, y su repercusión en la integridad biomecánica (amortiguador biológico) de dicha interfase conformada por esmalte y dentina(30), no ha sido descrito, siendo necesario de esclarecer.

Es por lo anterior que el presente estudio tiene como objetivo evaluar la influencia de la radiación ionizante sobre las propiedades físico-mecánicas (tenacidad a la fractura) y características ultraestructurales (contenido mineral y orgánico) del esmalte irradiado-UAD en comparación al tejido no irradiado.

2. Marco Teórico

2.1 Cáncer Oral.

El cáncer de cabeza y cuello (CC) corresponde al sexto cáncer más frecuente(24, 31, 32) con una incidencia de 600.000 casos al año a nivel mundial(33), correspondiendo con el 4%, causando 360.000 muertes anuales(34). Alcanza una tasa de supervivencia a cinco años del 50-60%(34-36), siendo los hombres aproximadamente dos a cuatro veces más afectados que las mujeres(37). En Chile, la incidencia es de 3907 casos por 100.000 habitantes(38), afectando 3,2 por encima a los hombres en comparación a 1,2 mujeres por 100.000 habitantes(38).

El carcinoma de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más común del cáncer oral y labio(39, 40), representando un 90%(40). Topográficamente afecta las superficies mucosas de los labios, piso de la boca, mucosa bucal, encía superior e inferior, paladar duro, trigono retromolar, orofaringe y lengua(41, 42). Siendo este último sitio el más frecuente(43). El tabaquismo y el alcohol, siguen siendo los factores de riesgo más comunes(31, 44), junto a la mala higiene bucal, dieta poco saludable, y la infección microbiana(31, 45)

Dentro de los enfoques de tratamiento se incluye el manejo único con cirugía, así como la terapia sistémica adyuvante (quimioterapia y / o agentes diana) y/o radioterapia(41). Dichos enfoques, van a generar secuelas que pueden provocar alteraciones físicas, emocionales y psicosociales, afectando así la calidad de vida de los pacientes(46-48).

2.1.1 Radioterapia.

La radioterapia constituye uno de los tratamientos de elección para el cáncer de cabeza y cuello(1), debido a su alta efectividad dentro de las opciones terapéuticas(2). Se emplea como tratamiento primario o como adyuvante de la

cirugía(3), donde cada subsitio específico dicta las técnicas de radioterapia, los campos, la dosis y el esquema de fraccionamiento adecuados(4). El objetivo principal de esta terapia, es lograr el control local del tumor mientras se minimiza el daño a los órganos críticos(4).

La radioterapia utiliza partículas u ondas de alta energía tales como: rayos X, rayos gamma, rayos de electrones o de protones, para generar lisis en las células cancerosas asociadas a la lesión tumoral(49). Dichas radiaciones pueden ser administradas por un equipo extracorporal (radioterapia de haz externo) o irradiadas a través del material radioactivo intracorpóreo, en áreas cercanas de las células/tejidos cancerosos (radioterapia interna, también llamada braquiterapia)(7).

La dosis de radiación óptima para cada tratamiento va a depender del tamaño y la ubicación de los tumores primarios y los ganglios linfáticos del cuello. En general, los tumores primarios y las linfadenopatías macroscópicas requieren una dosis total de 54 a 70 Gray (Gy), administradas bajo un programa de fraccionamiento estándar de: 2 Gy/fracción, una fracción/día, 5 fracciones/semanales(50).

Esta terapia no solo afecta la proliferación, metástasis y otros procesos biológicos asociados a las neoplasias, sino que también puede modificar genéticamente los tejidos normales periféricos, causando daño a las células no tumorales, lo cual constituye un efecto perjudicial(51). Esto se genera por la acción de la radiación ionizante sobre los tejidos, ya sea actuando de manera directa sobre ADN (rupturas de la doble cadena), estructuras de organelos, entre otros(5, 6); o de manera indirecta, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno (RNS) (7). Estas últimas, representan el 60% de los daños causados por las radiaciones ionizantes(52), y se provocan debido a la ionización o excitación de los componentes moleculares del agua y lípidos presente en los tejidos (7).

De manera particular, la radiación ionizante afecta el contenido orgánico de los tejidos, específicamente al colágeno por su alta susceptibilidad, abundancia y

distribución. Este se ve alterado en gran medida en sus propiedades físicas y químicas, debido al cambio conformacional que los ROS/RNS provocan, en la reticulación, e incluso hasta la escisión de enlaces covalentes de la cadena principal como de las cadenas laterales(8).

2.1.2 Efectos colaterales de la radiación sobre tejidos orales.

Los efectos colaterales de la radioterapia se observan en aquellos tejidos sanos adyacentes al campo de irradiación tumoral, luego de ser sometidos a altas dosis(41, 53). En el cáncer de cabeza y cuello, los tejidos principalmente involucrados de la cavidad oral son el maxilar, mandíbula y glándulas salivales(15). La severidad del efecto deletéreo sobre los tejidos, va a depender de la dosis de radiación y duración de la terapia, sin embargo, factores propios de los pacientes como la mala higiene oral, condición previas de los tejidos orales, tabaquismo y alcohol deben ser considerados como factores de mayor riesgo(15).

Los efectos colaterales pueden ser clasificados como temporales o agudos, por ser los de primera aparición, una vez iniciado el tratamiento de irradiación en los pacientes, y permanentes o tardíos, a aquellos que, si bien pueden aparecer desde etapas tempranas, son efectos deletéreos que se van a mantener de forma crónica, incluso por largos períodos de tiempo posterior a la radioterapia.

Dentro de los agudos se pueden describir: la mucositis oral(54), candidiasis(55, 56), disgeusia/ageusia, dermatitis, trismos, xerostomía/hiposalivación y disfagia.

- a) Mucositis oral: es la complicación más común durante el tratamiento y en casos severos podría llevar a la suspensión del tratamiento(15). Se inicia tras la segunda semana de tratamiento, causando dolor severo y dificultad para realizar funciones como: hablar, tragar y comer(15, 57).
- b) Candidiasis: Infección más común en los pacientes que reciben radioterapia(15), y afecta paladar blando, lengua, y mucosa yugal(55, 58).

- c) Disgeusia/ageusia: puede aparecer desde la segunda o tercera semana de tratamiento(59). La pérdida del gusto ocurre debido a un efecto directo de la radiación sobre las papilas gustativas, y a cambios en la saliva(60)
- d) Dermatitis: denominado radiodermatitis(61), afecta la piel dentro del campo de radiación, presentando alteraciones como eritema, descamación, necrosis , ardor y dolor(62)
- e) Trismos: ocurre cuando la articulación temporomandibular y los músculos masticadores se encuentran dentro del campo de radiación(60, 63)
- f) Xerostomía/hiposalivación: es una de las complicaciones más frecuentes(55), que conlleva a otras adicionales(15), debido a que facilita el desarrollo de mucositis, enfermedades periodontales, caries de radiación, e infecciones virales, fúngicas o bacterianas(15, 57, 64)
- g) Disfagia: su origen es multifactorial ya que puede deberse a hiposalivación, mucositis, fibrosis, edema, disminución de la sensibilidad en el tracto digestivo superior y depresión del reflejo tusígeno entre otros(65, 66)

Por su parte, en los efectos tardíos es posible observar: la xerostomía/hiposalivación de manera persistente, disfagia, osteorradionecrosis y caries relacionada con la radiación(15, 57, 59, 67).

- a) Osteorradionecrosis: se generan cambios irreversibles debido a una necrosis ósea isquémica por desvitalización del hueso, hipovascularización, hipocelularidad e hipoxia tisular local(58, 63, 68).

2.1.2.1 Glándulas salivales irradiadas.

Como fue expuesto anteriormente, los efectos adversos sobre las glándulas salivales son diversos, de acuerdo a la dosis de radiación acumulada, puede ocurrir hipofunción permanente de la glándula salival, junto con cambios cuantitativos y cualitativos en la composición salival(69), comprometiendo la salud bucal y general, disminuyendo así la calidad de vida del paciente(70-72).

La gravedad del daño glandular y el potencial de recuperación dependen de del volumen de la glándula irradiada, la dosis de radiación acumulada – dosis críticas desde los 40 Gy para la glándula Parótida y submandibular(70)- y la capacidad de repoblación de las células supervivientes(69). Esta pérdida de función se da desde la primera semana de tratamiento con una disminución continua en la tasa de flujo salival durante el curso de la terapia(73, 74), siendo además posible identificar una segunda fase de deterioro en la secreción hasta varios meses después de finalizada la radioterapia y es concomitante con cambios progresivos e irreversibles (75, 76). A lo anterior se suma una pérdida de inervación parasimpática(77) y una lesión de las estructuras vasculares adyacentes ((57)35, 43 -45)

Existe una pérdida de las células acinares mucosas y serosas, siendo estas últimas susceptibles a una muerte temprana producto de la ruptura de membranas y a la apoptosis celular inducida por la radiación ionizante(78, 79). La diferencia de radiosensibilidad entre las células acinares se ha atribuido a la presencia de metales pesados en los gránulos secretores serosos(80, 81), que absorben la energía de la radiación promoviendo la liberación y acción de radicales libres(80, 81), explicando así el aumento de la viscosidad de la saliva- debido a una proporción anormalmente alta de material orgánico(82)- y la disminución del pH – reducción de la capacidad de tampón-, variación de inmunoglobulinas, proteínas antimicrobianas y caída electrolitos salivares(60, 69, 77, 83).

Particularmente existe un aumento en las inmunoglobulinas (IgA, IgG), lisozimas, lactoferrina y albúmina durante la radiación, hasta 6 a 18 meses posteriores(70), y una caída en la amilasa salival que se mantiene posterior al termino de la radioterapia(70). En cuanto a los electrolitos existe una disminución en el bicarbonato y los fosfatos, con aumento del sodio, cloro, potasio, magnesio y calcio, recuperando sus niveles normales 18 meses después de culminada la radioterapia(70).

2.1.3 Efectos colaterales de la radiación sobre tejidos duros dentales.

2.1.3.1 Esmalte irradiado.

En el esmalte irradiado los cambios degenerativos ante la exposición a la radiación ionizante se observan tempranamente, con dosis desde los 30 Gy(84), viéndose aumentados en un factor de 10 cuando estas superan los 60 Gy(85).

Existe reducción de la microdureza del esmalte(10), del módulo de elasticidad, e índice de cristalinidad, debido a cambios micromorfológicos como: acortamiento de las varillas del esmalte(27, 28), pérdida del patrón de disposición regular y erosión del prisma, destrucción progresiva de la sustancia interprismática(84), aumento de la proporción proteína/ mineral, lo que lleva a una estructura amorfa(11, 84, 86). Lo anterior se refleja en la disminución de la capacidad del tejido para resistir la deformación durante la masticación(87), lo que ocasiona una pérdida del tejido prismático, posterior al avance de microfisuras que llevan a una mayor susceptibilidad a la fractura por cizallamiento(88).

2.1.3.2 Dentina irradiada.

La tendencia a la susceptibilidad de la dentina frente a la radiación ionizante es similar a la del esmalte dental, debido a se observan cambios micromorfológicos con dosis desde 30 Gy(84). Sin embargo, al ser un tejido con mayor contenido orgánico, principalmente colágeno I, estos efectos son más dramáticos, y con mayores consecuencias en la preservación de la homeostasis del órgano dentino-pulpar(10, 84). Se ha reportado degeneración de los procesos odontoblasticos y de la red colágena, reducción de la proporción proteína/mineral, obliteración de los túbulos dentinarios con grietas en sus paredes(84) y formación de espacios en la unión esmalte dentina(11, 89).

Como citado anteriormente, el alto contenido orgánico de la dentina, la hace un tejido altamente vulnerable a los ROS y RNS, lo que provoca alteración en las

estructuras proteicas secundarias y terciarias, con efectos nocivos sobre la hidratación de la red colágena, obteniendo un tejido seco y friable, propenso a la fragmentación sus fibras(84).

2.1.3.3 Caries de la radiación.

La caries dental es una de las enfermedades no transmisibles más prevalente en la actualidad(37), resultado de la pérdida del equilibrio dinámico entre el huésped, el medio ambiente y el microbioma oral(90).

Lo anterior es explicado por Marsh 1994(91) en la teoría ecológica de la caries (Figura A) donde la composición microbiana de la biopelícula es estable a menos que ocurran “perturbaciones ambientales” que puedan afectar la homeostasis microbiana(90), donde la dieta (principalmente azúcares libres), la higiene bucal y los cambios en la composición salival dan como resultado períodos prolongados de pH bajo en la biopelícula, lo que altera esta relación simbiótica contribuyendo a la disbiosis(90). Tales condiciones inhiben el crecimiento de especies beneficiosas e impulsan la selección de bacterias con un fenotipo acidógeno y acidúrico(92, 93), tales como *Streptococcus Mutans* (EM), *Lactobacillus*, *Scardovia Wiggsiae* y varias especies de *Actinomyces*(92) aumentando el riesgo de caries.

Esta patogénesis involucra ácidos orgánicos, el subproducto del metabolismo microbiano de los azúcares libres de la dieta(94). Donde a medida que el pH de la biopelícula disminuye, alcanza un punto en el que el fluido de la biopelícula en la superficie del diente está sub-saturado con respecto al mineral del diente, y se produce la disolución para mantener el equilibrio(95). Dicho proceso inicia en la superficie del diente, específicamente en el esmalte, y continúa avanzando hacia la dentina si las condiciones desfavorables persisten(92, 96).

TEORÍA ECOLÓGICA DE MARSH

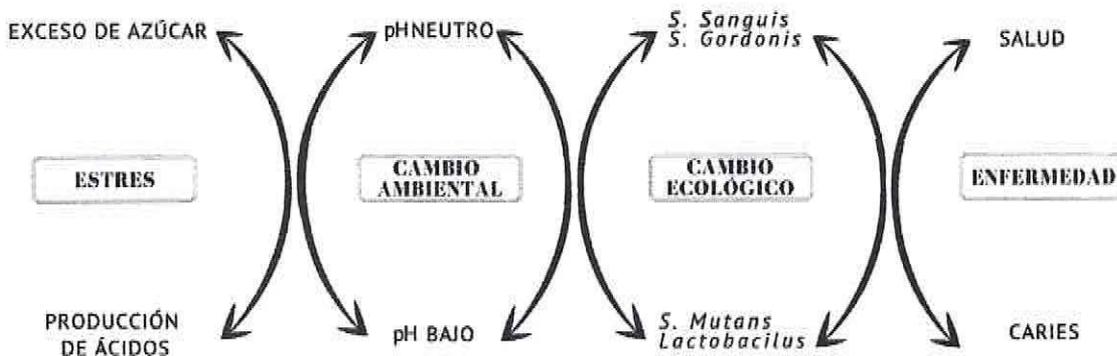


Figura A: Esquema de la Teoría ecológica propuesta por Marsh (1994). (Autor: Marsh, 1994)(91)

Si bien las lesiones de caries comparten el aspecto multifactorial que les da origen en los tejidos duros del diente, las caries asociadas a la radiación ionizante difieren en su aspecto clínico, patrones de aparición y progresión de lesiones no asociadas a radioterapia(24, 28, 85).

Estas lesiones ocurren posterior al tratamiento de radiación, y es consenso en la literatura, que esto es debido al daño colateral que se produce tanto en las estructuras dentales (cambios en las propiedades mecánicas, micromorfología, propiedades de los cristales de hidroxiapatita, y composición química)(24, 84) como por la hipofunción generada sobre las glándulas salivales(55, 86, 97). Tiene una incidencia de entre un 29% al 37% en pacientes sometidos a dosis de radiación medias a altas(86), alcanzando un índice COPD de 9,19(98).

Clínicamente se observa un avance acelerado y agudo(10), donde se ven afectadas las superficies lisas del diente específicamente el área de unión amelodentinaria – cervical-(12-15), o zonas atípicas -bordes incisales o cúspides de los dientes-(99) adquiriendo un color oscuro o marrón difuso(99). Se caracteriza además por iniciar con una fractura de cizallamiento del esmalte -delaminación-, lo que determina el mayor riesgo de deterioro de la superficie externa de la dentina

subyacente(18, 84), exponiéndola además al medio oral alterado de estos pacientes desde los tres meses posterior a la radiación(100).

Lo anteriormente descrito conlleva a secuelas que pueden ser catastróficas en estos pacientes inmunológicamente comprometidos, como son infecciones odontogénicas con riesgo de osteorradionecrosis(58, 101) En consecuencia, la calidad de vida de los pacientes, tanto en la interacción social (48), como en el desarrollo de funciones orales básicas (masticación, habla, entre otras)(47) se ve disminuida, además del dolor asociado a la progresión de estas lesiones(102).

2.1.4 Microbioma y radiación.

Existe una creciente evidencia de que los miembros del microbioma humano están altamente asociados con una amplia variedad de tipos de cáncer(103). Los impactos de la radiación sobre el microbioma oral son aún desconcertantes, se ha propuesto que las fluctuaciones observadas en la disposición del microbioma en las superficies epiteliales en pacientes contribuyen a la patogénesis de la mucositis oral(104, 105).

Posterior a la radioterapia es posible observar cambios en el microbioma(106-108), dados por un aumento de *Streptococcus Mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus* y bacterias cariogénicas como *Lactobacillus spp*(109) y *Streptococcus Mutans*(110, 111), mientras que el nivel de *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium Nucleatum*(112) y *Neisseria* disminuyó después de la radiación(113). En cuanto a los hongos, existe un aumento en el número de *Cándida albicans*(109, 112).

3.1 Histología Dental.

3.1.1 Esmalte Dental.

El esmalte es un material nanocompuesto jerárquico con una organización intrincada(114, 115), la cual es la clave de su rendimiento mecánico. Es el tejido más calcificado del cuerpo humano y a su vez el que posee menor contenido orgánico(116). Su composición química está dada por aproximadamente un 96% de cristales de apatita inorgánica, un 1% de material orgánico y 3% de agua(117, 118).

La unidad básica que compone el esmalte dentario es el prisma o varilla de esmalte que posee un tamaño de 30 nm de espesor y 60 nm de ancho(21), el cual se encuentra envuelto en una vaina de matriz orgánica(119). Cada uno de estos está asociado a un contenido de esmalte interprismático, que consiste en nanocristales dispuestos en un ángulo de 60° respecto al eje mayor de éste(114). Los prismas del esmalte se encuentran alternados, paralelos, oblicuos y entrecruzados(120) extendiéndose como una matriz compacta desde la unión amelodentinaria(UAD) hasta la superficie del esmalte encontrándose aproximadamente perpendiculares al límite o UAD(116). En las áreas cuspídeas e incisales las varillas se retuercen y entrecruzan, lo que se denomina decusación(116). Dicho patrón, es un mecanismo de endurecimiento estructural responsable de la resistencia del esmalte al crecimiento de grietas o fracturas en estas áreas de mayor esfuerzo masticatorio(121, 122).

Próximo a la UAD, la estructura del prisma del esmalte no está completamente desarrollada, de modo que dicho tejido muy cerca de esta unión puede parecer aprismático o sin la estructura prismática, disminuyendo su dureza superficial a medida que se acerca al tejido dentinario, en comparación con el esmalte oclusal o cuspídeo(116).

A nivel nanoestructural, la unidad básica de cada varilla es una serie de nanocristales de apatita carbonatada paralelos morfológicamente entre sí, y

alineados aparentemente con su eje c (eje mayor), a lo largo del eje de la varilla(123), donde cada uno de ellos posee un ancho de $\sim 50 \mu\text{m}$ y más de $10 \mu\text{m}$ de largo(124). Sin embargo, en cuanto a sus orientaciones cristalográficas no se encuentran coorientados, es decir, la extensión del ángulo de sus ejes c dentro de cada varilla es de 30° generalmente, y hasta 60° o incluso 90° de manera ocasional(125). Lo anterior proporciona al tejido un mecanismo de endurecimiento a nivel ultraestructural, ya que la diferencia de orientación entre nanocristales provoca que una grieta o falla debe propagarse a lo largo de las interfases de los nanocristales, sufriendo deflexión a cada paso(125), aumentado con ello la tenacidad a la fractura del esmalte a nano escala(125).

Cada uno de los nanocristales dentro de una varilla del esmalte se encuentran apoyados entre sí, con una matriz orgánica que también se encuentra a este nivel en forma discontinua en el medio(119).

Por su parte, los nanocristales de hidroxiapatita de la zona interprismática, están predominantemente coorientados en grandes áreas del esmalte, con una angulación de 30° (125), siendo denominados por algunos autores como "fase continua del esmalte"(114). (Figura B).

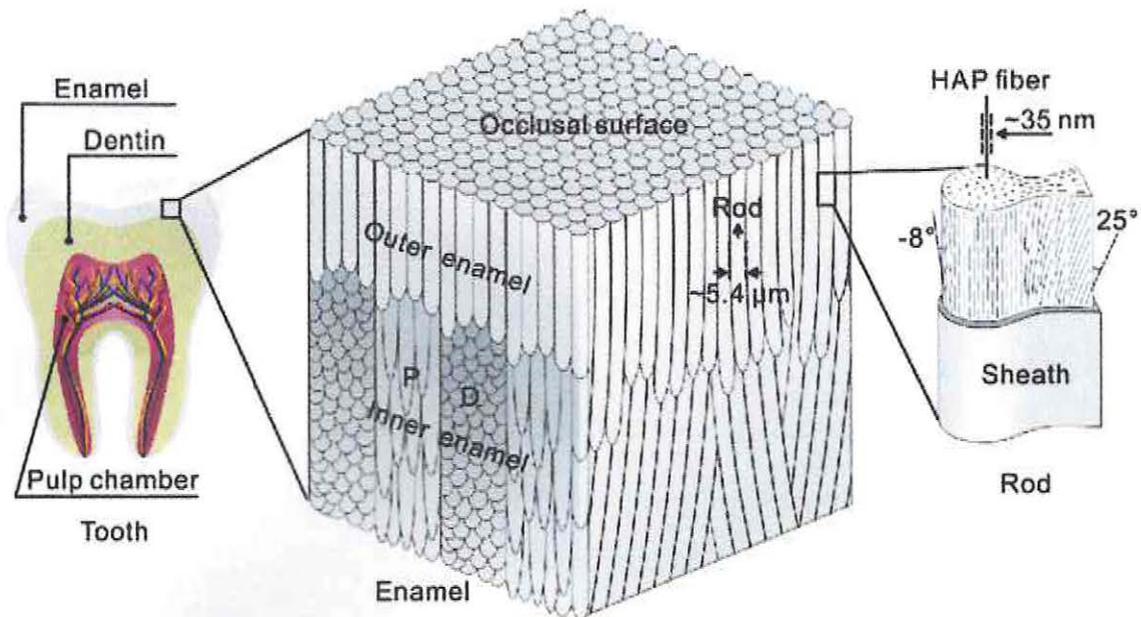


Figura B: Esquema de la composición jerárquica del esmalte dental. (Autor: Weng Z. y colaboradores, 2016)(126).

En cuanto a la matriz orgánica del esmalte, esta se encuentra a 300 μm desde la UAD hacia la superficie externa del diente(127), teniendo mayor presencia en zona de cúspides en comparación zonas cervicales(127).

Se encuentra compuesta por colágeno tipo IV y VII, XII(128) y enamelinina (MMP-20)(127, 129). Además de proteínas no colágenas (PNC) que son parte de dicha matriz en menor proporción, entre las que se encuentran: amelogenina (AMEL) – isoforma 1 y 3(130)-, la más abundante alcanzando un 90% dentro de las PNC; ameloblastina (AMBN) en un 5%, enamelinina (ENAM) en un 1% y en menor concentración calicreína 4 (KLK4) que representan <1% de las PNC(130, 131); además de proteínas inespecíficas como albúmina sérica y antitrombina(132).

Las fibrillas de colágeno se entrelazan con el mineral del esmalte, estando los cristales de fosfato de calcio dentro o entre ellas(19) combinándose con la red fibrilar de la matriz dentinaria interna(133). Cada una de ellas, en su microestructura

está formada por haces de microfibrillas altamente reticuladas con enlaces covalentes(134), que proporcionan estabilidad a la red colágena(19).

El colágeno tipo IV (cadenas α) o colágeno no fibrilar(135), el principal componente de las membranas basales, caracterizándose por su capacidad formar redes de manera tridimensional (136). Son moléculas más largas que los colágenos fibrilares y contienen varias discontinuidades en la repetición (Gly-X-Y)(137). Se vinculan con redes de laminina a través de hidroxilos, puentes disulfuro y por enlaces cruzados de lisina, confiriendo así mayor estabilidad mecánica a la estructura(138).

Por otro lado el colágeno VII es el componente principal de las fibrillas de anclaje, que conecta y estabiliza las membranas basales(139) con el esmalte subyacente, interactuando con el colágeno tipo IV subyacente, el colágeno I de la matriz y la laminina V(140, 141).

Finalmente el colágeno XII, es parte de la familia de colágenos asociados a fibrillas con triple hélices interrumpidas (FACITS)(137). Este grupo modula las propiedades superficiales de los colágenos fibrilares incorporándose en el espacio interfibrilar en fibrillas escalonadas, localizándose en la membrana basal o en las uniones que separan diferentes tipos de tejidos(136), co-localizándose en tejidos ricos en colágeno tipo I(142).

3.1.2 Unión amelodentinaria (UAD)

La unión o límite amelodentinaria (UAD), es una estructura tridimensional compleja y crítica, que permite la unión intrincada y transición de dos tejidos morfológico y embriológicamente diferentes(21). Se ha descrito que representa la posición original de la membrana basal de ameloblastos y odontoblastos(22). Debe ser considerada como una amplia región de transición entre dos tejidos que interactúan y no como una interfaz discreta(22).Siendo una zona anatómicamente delgada con un ancho funcional más amplio; donde el esmalte y la dentina cerca de

dicho límite tienen microestructuras y propiedades ligeramente diferentes a las fases masivas más distantes(143).

Alcanza los 45 μm de ancho separando el esmalte y la dentina(19); tejidos que poseen diferentes propiedades mecánicas, por un lado el esmalte es duro, quebradizo y rígido(22) y la dentina es más flexible, resistente (22) y elástica debido a la presencia de colágeno(144). Dichas diferencias permiten que esta zona de transición sea responsable de restringir la propagación de grietas bajo carga masticatoria(21) y mejorar la longevidad del diente debido a sus patrones orgánicos y minerales particulares(22, 145). Además reduce las concentraciones de estrés y actúa como un mecanismo de endurecimiento entre tejidos mecánica y estructuralmente diferentes(22).

La variación del contenido inorgánico de esta zona de transición inicia con una intensidad alta en fosfato de calcio (cercano al esmalte), disminuyendo en su capa interna, asociándose a una menor dureza y rigidez(20) y termina completamente al cruzar hacia la dentina(19). En los túbulos dentinarios se observa un patrón regular de fosfato donde la dentina peritubular es rica en este mineral.

En cuanto al contenido orgánico se distribuye de manera opuesta, existiendo bajo colágeno en el esmalte y aumentado progresivamente hacia dentro de los túbulos dentinarios (19), con un contenido intermedio en la zona de transición. Este contenido orgánico está representado por la reticulación del colágeno, a través de sus enlaces covalentes, donde la amida I (sub-bandas 1660 y 1690 cm^{-1}) es la banda más reportada(19). Así la composición de esta zona está dada principalmente por proteínas colágenas tipo I,IV,VII,XVII(128, 146), proteínas fosforiladas y no fosforiladas como amelogenina y ameloblastina(21, 128), donde su interacción con el colágeno le otorga continuidad funcional a esta interfaz(21).

Es importante destacar que la proteína colágena tipo IV, contiene cadenas alfas macromoleculares que le permiten formar una estructura de red interactuando con el colágeno tipo VII y en su conjunto con el colágeno tipo I formando complejos

multiméricos(147). En tanto el colágeno tipo VII, adquiere un patrón helicoidal distribuyéndose cercano a las zonas con primas de esmalte en cúspides, pero prácticamente ausente en zonas cervicales(148)

Sumado a lo anterior tanto los haces gruesos de colágeno tipo I (1-5 μm de diámetro)(149), como el colágeno tipo VI adquieren una posición paralela a la superficie del diente(148), con lo que podrían estabilizar la UAD explicando su tenacidad a la fractura y resistencia a la propagación de grietas(149).

Por otro lado el colágeno XVII, es parte de la familia de colágenos transmembrana, siendo parte del complejo de anclaje del hemidesmosoma, que une células epiteliales a la membrana basal subyacente (Figura C)(150).

Finalmente se ha reportado en esta transición de tejidos una mayor proporción de gelatinasas , específicamente las metaloproteinasa 2 (gelatinasa A) y metaloproteinasa 9 (gelatinasa B)(145).

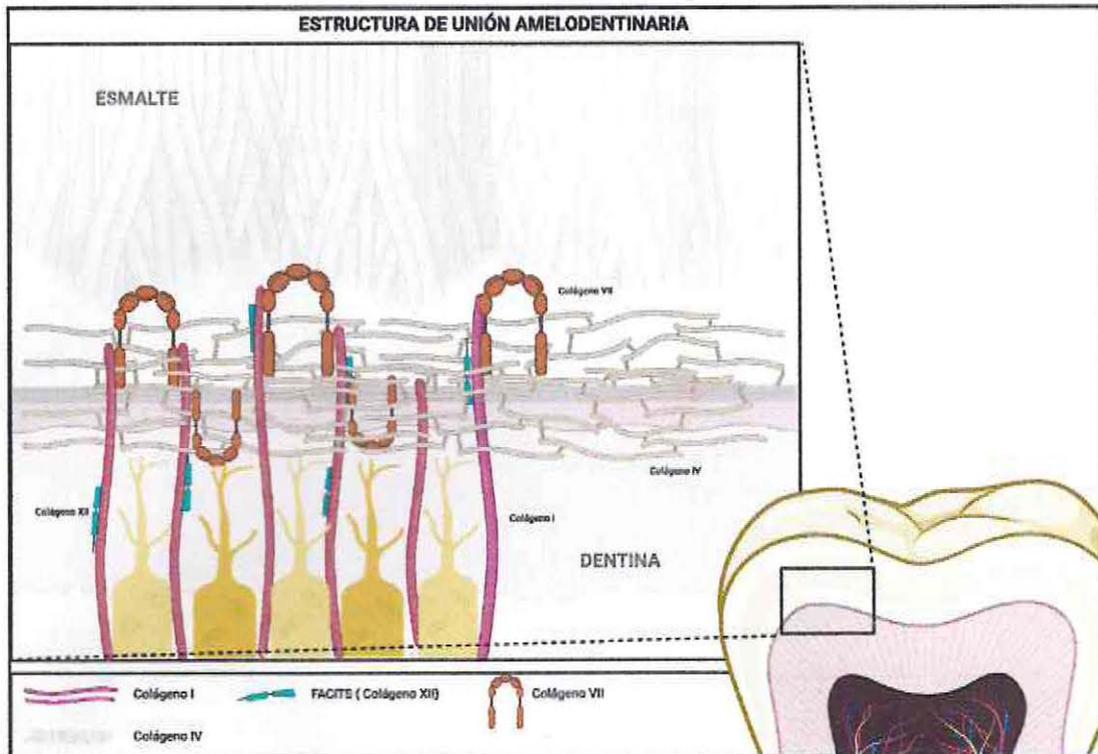


Figura C: Composición estructural de la unión amelodentaria. Adaptación Autor: *Fratzl P., 2008*(137).

3.1.3 Dentina

La dentina es un tejido calcificado rico en proteínas(19), metabólicamente activo, que tiene la capacidad de reparación ante una noxa, mediante la formación de tejido dentinario durante toda la vida(151).

Tiene una micromorfología compuesta por túbulos de 1-2 μm (152) de diámetro rodeados por una capa hipermineralizada ($\sim 1 \mu\text{m}$) llamada dentina peritubular, y una matriz intertubular más blanda, donde el material orgánico se concentra(153). Dichos túbulos se extienden desde la pulpa dentinaria hasta la unión amelodentaria y cementodentaria (154).

Se compone por un 30% de matriz orgánica, 50% de contenido inorgánico de apatita carbonatada y 20% de agua(152). En cuanto a la matriz orgánica contiene

principalmente colágeno tipo I (constituyendo un 90%) con trazas de colágeno tipo III y IV (en un 3%)(144, 155), además se ha encontrado en menor proporción proteínas no colágenas como proteoglicanos, osteonectina, enamellina, sialoproteína(156) fosfoproteínas(157) y proteínas de la familia de serpinas, antitrombina-III y la alfa-1-antitripsina(130).

La fibra de colágeno tipo I tiene un tamaño de 100-200 nm(158) el cual resulta del autoensamblaje de dos cadenas -alfa 1 y alfa 2 -, originando una triple hélice con una conformación de espiral enrollado(144), dando una estructura de red tridimensional(19).

Las fibrillas de colágeno están constituidas por haces de microfibrillas reticuladas dispuestas por el escalonamiento de las moléculas de colágeno(134). Dichas reticulaciones endógenas proporcionan enlaces covalentes a la microestructura, influyendo en la estabilidad de la matriz de colágeno y con ellos en las propiedades mecánicas de la dentina (Figura D)(159).

En tanto el colágeno tipo III, también se caracteriza por formar fibrillas, siendo al igual que el colágeno tipo I y IV, los más abundantes en el ser humano(160).

Por otro lado, su contenido inorgánico está dado por los cristales de fosfato de calcio que mineralizan las fibras de colágeno en su interior como entre ellas(19). Dicho contenido inorgánico mineral es fundamental para los desafíos mecánicos durante la función masticatoria, ya que actúan como rellenos de compresión endureciendo las fibras de colágeno(161, 162), permitiendo así un aumento en la resistencia total de la dentina(163).

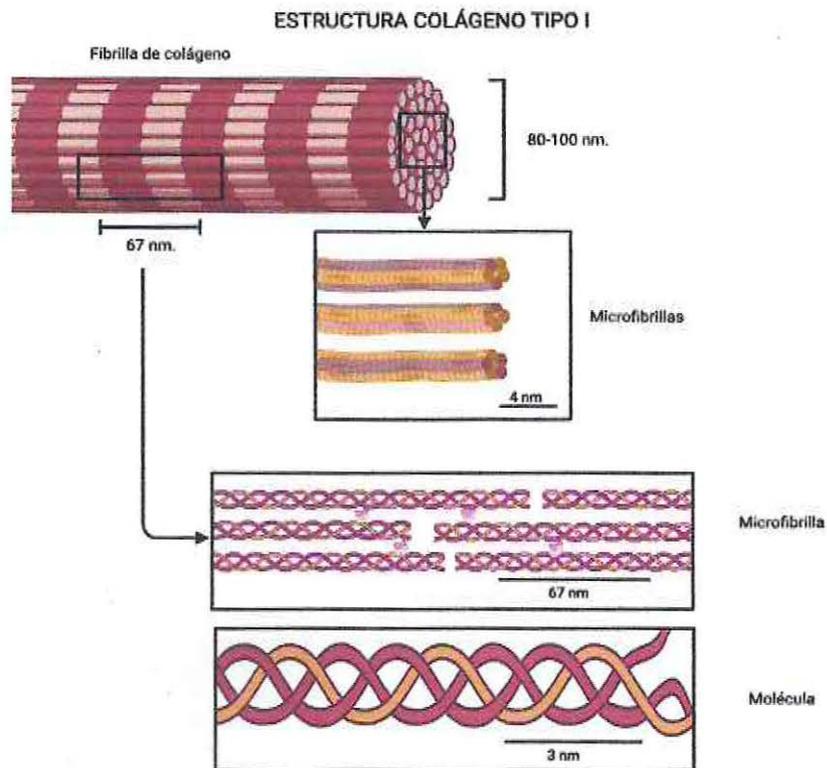


Figura D: Estructura macro y micromolecular de colágeno tipo I. Adaptación Autor: Vidal C. y colaboradores, 2014)(134).

4. Pregunta de investigación

¿Existe influencia de la radiación ionizante sobre las propiedades físico-mecánicas (tenacidad a la fractura) y características ultraestructurales (contenido orgánico e inorgánico) del esmalte-UAD irradiado en comparación al tejido no irradiado?

5. Hipótesis de trabajo

La radiación ionizante influye sobre las propiedades físico-mecánicas y características ultraestructurales del esmalte-UAD en comparación al tejido sano no irradiado.

5.1 Hipótesis de investigación (H_0):

1. La radiación ionizante no influirá en la tenacidad a la fractura (K_{Ic}) del esmalte-UAD *in vitro* en comparación al tejido sano de dientes humanos extraídos.
2. La radiación ionizante no influirá en el contenido inorgánico (razón de carbonato / fosfato, índice de cristalinidad [CI], y morfología) del esmalte-UAD *in vitro* en comparación al tejido sano de dientes humanos extraídos.
3. La radiación ionizante no influirá en el contenido orgánico (razón de amida III / fosfato, amida I y sub-bandas 1660/1690, y fosfolípidos) del esmalte-UAD *in vitro* en comparación al tejido sano de dientes humanos extraídos.

6. Objetivo General

Evaluar la influencia de la radiación ionizante sobre las propiedades físico-mecánicas (tenacidad a la fractura) y características ultraestructurales del esmalte-UAD en comparación al tejido no irradiado.

6.1 Objetivos específicos:

- 1) Evaluar la tenacidad a la fractura (K_{Ic}) del esmalte-UAD irradiado *in vitro* en comparación al tejido sano de dientes humanos extraídos.
- 2) Evaluar el contenido inorgánico (razón de carbonato / fosfato, índice de cristalinidad [CI] y morfología) del esmalte-UAD irradiado *in vitro* en comparación al esmalte-tejido sano de dientes humanos extraídos.
- 3) Evaluar el contenido orgánico (razón de amida III / fosfato, amida I y sub-bandas 1660/1690, y fosfolípidos) del esmalte-UAD irradiado *in vitro* en comparación al esmalte-tejido sano de dientes humanos extraídos.

7. Materiales y métodos

7.1 Tipo de estudio: Estudio Experimental *in vitro*.

7.2 Tipo de muestra: Probabilístico, debido a que los dientes a utilizar fueron seleccionados aleatoriamente para la aplicación de cada intervención.

7.3 Selección de la muestra:

Para el cálculo de muestra se considero protocolos disponibles en la literatura con relación a los grupos control seleccionando el valor (2,07 MPa) y desviación estándar (0,75) de la tenacidad a la fractura (121). De esta forma se obtuvo un total de 6 dientes humanos como mínimo por grupo (n=6), valor obtenido a través de un test de cálculo de equivalencia, considerando un nivel de significancia del 5% y una potencia de 80%.

Basados en la literatura (Perdigao y cols, 2014)(164) serán necesarios 6 cuerpos de prueba por grupo para observar una magnitud del efecto detectable entre los grupo control y los experimentales con una potencia de 80% y nivel de significancia de 5% (alfa).

Se utilizó las siguientes fórmulas:

$$n = f(\alpha/2, \beta) \times 2 \times \sigma^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2$$

$$f(\alpha, \beta) = [\Phi^{-1}(\alpha) + \Phi^{-1}(\beta)]^2$$

Donde μ_1 y μ_2 son el *outcome* del control y del grupo experimental respectivamente y σ^2 es la desviación estándar (10,5), Φ^{-1} es la función de distribución acumulativa de una desviación normal estandarizada. Ajustes por cruce basados en la fórmula.

$n_{adj} = n \times 10,000 / (100 - c_1 - c_2)^2$, Donde c_1 and c_2 son los porcentajes de cruce en el control y el grupo experimental respectivamente.

En base a lo anterior se trabajó con un número de 12 dientes humanos que fueron aleatoriamente divididos según la dosis de radiación (0 y 70 Gy) y la dirección de los prismas de esmalte, según lo indica el cuadro 1.

Se añadió por triplicata 3 dientes adicionales para test de Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

Cuadro 1: Grupos de estudio:

Grupos	Tipo de grupo	Descripción	Nº
Esmalte paralelo sin irradiación. (EPC1)	Control 1.	Cubo de esmalte 2x2 mm con prismas de esmalte ubicados paralelo a línea de fractura. 0 Gy (No irradiado).	6
Esmalte paralelo irradiado con 70 Gy (EPI1)	Grupo de prueba 1	Cubo de esmalte 2x2 mm con prismas de esmalte ubicados paralelo a línea de fractura. Irradiado con 70 Gy	6
Esmalte oblicuo sin irradiación. (EOC2)	Control 2.	Cubo de esmalte 2x2 mm con prismas de esmalte ubicados oblicuos a línea de fractura. 0 Gy (No irradiado).	6
Esmalte oblicuo con 70 Gy (EOI2)	Grupo de prueba 2	Cubo de esmalte 2x2 mm con prismas de esmalte ubicados oblicuos a línea de fractura. Irradiado con 70 Gy	6

7.4 Criterios de inclusión y exclusión

7.4.1 Criterios de inclusión:

- Terceros molares obtenidos bajo consentimiento informado.
- Terceros molares libre de caries con corona íntegra.
- Terceros molares incluidos.

7.4.2 Criterios de exclusión:

- Terceros molares que no han sido manejado con cadena de conservación adecuada.
- Abordaje quirúrgico (odontosección- fracturas de esmalte)
- Terceros molares que poseían alguna alteración del esmalte (hipoplasia, fluorosis, amelogenesis imperfecta etc)

7.5 Variables:

7.5.1 Variables Independientes.

Variable	Tipo de variable	Unidad de Medida	Definición conceptual	Definición operacional
Dosis de radiación.	Cualitativa nominal	Gray (Gy)	Dosis de radiación absorbida por un tejido biológico atravesado por una radiación.	Existencia o no de radiación a la cual fue sometida la muestra, simulando la dosis de radiación en tratamientos de cáncer oral.
Dirección de prismas de esmalte.	Cualitativa Nominal	Paralelo/ Oblicuo.	Dirección de los prismas de esmalte respecto a la línea de propagación a la fractura.	Observación mediante lupa binocular OLYMPUS SZ60 de disposición de prismas de esmalte respecto a línea de propagación a la fractura.

7.5.2 Variables Dependientes.

Variable	Tipo de variable	Unidad de Medida	Definición conceptual	Definición operacional
Contenido orgánico	Cuantitativa continua	cm ⁻¹	Contenido de proteínas del tejido en estudio.	Medición por espectrometría de la razón de contenido orgánico (amida III/ fosfato y amida I y sub-bandas 1660-1690, y fosfolípidos) de un cuerpo
Contenido Inorgánico	Cuantitativa continua	cm ⁻¹	Contenido mineral del tejido en estudio	Medición por espectrometría de la razón de contenido inorgánico (carbonato/fosfato) de un cuerpo
Tenacidad a la Fractura	Cuantitativa continua	K _{Ic}	Resistencia que opone un material al crecimiento de una grieta.	Valores obtenidos al someter un cuerpo de estudio a la tensión suficiente para propagar un defecto preexistente en K _{Ic}

7.6. Métodos:

7.6.1 Tenacidad a la Fractura (K_{Ic})

Una vez obtenidos los cuerpos de prueba a partir de cada diente, se aplicó como técnica la prueba de tenacidad a la fractura, la cual aplicó una carga constante por medio de una máquina de ensayo universal (Instron Emic 23-5S, Sao Jose dos Pinhais, PR, Brasil), a una velocidad constante de ensayo de 0.1 mm/min, hasta el punto de fractura. La carga medida en Newton (Fuerza [F]), en relación al área de contacto (Área [mm^2]) determinó la tenacidad a la fractura en K_{Ic} según la siguiente fórmula(121):

$$K_{Ic} = \frac{P}{B^* \sqrt{W}} \sqrt{\frac{B^* + 1}{B + 1}} (1.69 - 8.01\alpha + 12.53\alpha^2) [\text{MPa m}^{0.5}]$$

7.6.2 Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

Para el análisis se utilizó la técnica de ATR FTIR, en el tejido de esmalte de cada grupo después de la aplicación del tratamiento de radiación ionizante (0 y 70 Gy) según correspondía. Fue utilizado un espectrómetro FTIR (Nicolet iS5, Thermo-Nicolet Instruments, Madison, WI, EE. UU.). Los espectros fueron recogidos entre 4000 y 400 cm^{-1} , a una resolución espectral de 4 cm^{-1} , con un cristal de diamante (Smart Orbit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), Mediante la adición conjunta de 64 escaneos.

Se considero la banda de absorción característica de los enlaces peptídicos de amidas I y III (Tabla 1) para los componentes proteicos, las bandas de carbonato y fosfato, y para la comparación semicuantitativa entre los grupos, se restó la señal de fondo. Además fueron analizados *peaks* asociados al contenido de fosfolípidos en el tejido dentario mineralizado (Tabla 1)

Tabla 1: Asignación general de bandas para los espectros de ATR-FTIR de tejido duro dental.

Picos de número de onda.	Nombre.	Definición.
1680-1600	Amida I.	Proteína C=O estiramiento de proteína, Colágeno tipo I.
1480-1580	Amida II.	Proteína N-H curva junto con estiramiento. Colágeno tipo I.
1200-1300	Amida III.	Proteína N-H curva junto con estiramiento. Colágeno tipo I.
1400-1580	$\nu^3 \text{CO}_3^{2-}$	Modo de vibración de banda carbonato.
963	$\text{PO}_4^{3-} \nu^1$	Modo de vibración de banda fosfato.
602	$\text{PO}_4^{3-} \nu^2$	Modo de vibración de banda fosfato.
1033	$\text{PO}_4^{3-} \nu^3$	Modo de vibración de banda fosfato.
562	$\text{PO}_4^{3-} \nu^3$	Modo de vibración de banda fosfato.
2961	C-H	Acido caproico, Modo estiramiento.
2600-3200	C-H	Rango de fosfolípidos tipo Alcano, ν^1 <i>peptide modo</i> .

Rangos y bandas de tabla: Muñoz y cols. (2020)(10, 165, 166)

El resultado de las áreas debajo de los picos fue normalizado a la absorbancia de la frecuencia de $\nu_3\text{PO}_4$ en 1015 cm^{-1} .

Finalmente fue calculado el Índice de Cristalinidad (IC_{FTIR}), bajo la ecuación: $\frac{1}{4}I_{551} \text{ p } I_{597} / I_{588}$, donde I_{551} , I_{597} e I_{588} representan las intensidades de las bandas 551 , 597 y 588 cm^{-1} , respectivamente. Se utilizó el software OMINIC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) Para la normalización de los espectros y los análisis.

7.7 Pertinencia de la técnica.

Las pruebas *in vitro* permiten al investigador controlar las condiciones del estudio(167) (la selección de los grupos de tratamiento, la naturaleza de las intervenciones, el tratamiento durante el seguimiento y la medida de los resultados) a fin de establecer comparaciones sin sesgos(168).

Otros autores establecen ventajas como: **1-** la rapidez de reunir los datos sobre un parámetro/propiedad específica, **2-** la relativa facilidad de la metodología del test utilizado comúnmente, **3-** la posibilidad (necesidad) de medir un parámetro específico, mientras se mantienen otras variables constantes, **4-** ser capaz de comparar directamente el desempeño de un material/técnica nueva y/o experimental con un Gold standard , **5-** ser capaz de probar simultáneamente muchos (dentro de ciertos límites) grupos experimentales, dentro de un mismo estudio, y **6-** ser capaz de utilizar instrumentos/protocolos de bajo costo(169)

Estas pruebas en líneas generales se pueden clasificar en dos grupos principales(170): mediciones de las propiedades físicas y las simulaciones de comportamiento clínico. En el primer grupo se encuentran las pruebas estandarizadas de fuerza, tenacidad a la fractura, la dureza, la expansión térmica, entre otras, sin la utilización de muestras dentales. En el otro grupo encontramos las simulaciones de comportamiento clínico que buscan crear condiciones de reto físico y químico presentes en la cavidad oral, sometiendo a los cuerpos a cargas

(monotónicas o cíclicas), a variaciones térmicas, utilizando especímenes clínicamente reales(171).

7.8 Control de sesgos y limitaciones.

Una de las limitaciones del estudio es su naturaleza experimental *in vitro*, del cual se obtendrán resultados en tiempo inmediato. Se debe considerar, además, que se comparo tejido dentario sano (0 Gy) versus tejido dentario sometido a dosis máxima de radiación (70 Gy), pudiendo existir variaciones respecto a menores dosis de radiación ionizante.

El sesgo de instrumento se controló con la calibración por concordancia intra-evaluador del operador a través de estudio piloto.

7.9 Consideraciones de bioseguridad.

Se ingreso al laboratorio contando con las medidas de protección personal correspondientes: guantes, mascarilla, delantal y lentes de protección; debido a que se manipularon muestras biológicas, y se utilizó maquinaria de corte.

7.10 Materiales utilizados:

Fueron utilizados los siguientes materiales para la confección de la muestra (Cuadro 2) (117).

Cuadro 2: Materiales utilizados

Material/ N°Lote	Fabricante	Composición	Presentación
Resina Bulk fill flowable	Dentsply	Resina de Dimetacrilato de uretano modificado patentada	
Total Etch	Ivoclar Vivadent.	Ácido Ortofosfórico	
Heliobond	Ivoclar Vivadent	Bis-GMA, TEGDMA, iniciadores, estabilizadores.	
Adhesivo universal Scotchbond	3M-ESPE	Monómero de fosfato MDP, resinas de dimetacrilato, HEMA, copolímero de ácido polialquenoico modificado con metacrilato, relleno, etanol, agua, iniciadores y silano.	

Bis-GMA: Bisfenol glicidil metacrilato; TEGMA: Dimetacrilato trietilenglicol; HEMA: Etoxietil metacrilato; MDP Metacriloxidecilfosfato dihidrogenado.

7.11 Preparación de la muestra:

7.11.1 Test de Tenacidad a la fractura (K_{Ic})

Bajo donación se utilizaron terceros molares de pacientes remitidos a pabellón de Cirugía de la Facultad de Odontología UV, donde fueron extraídos por indicación terapéutica, previamente firmado el consentimiento informado. Los dientes extraídos fueron inmediatamente congelados a 20°C.

Para la etapa de caracterización de la muestra, los 12 terceros molares incluidos fueron distribuidos en 4 grupos según las siguientes variables: Irradiación (irradiado a 70 Gy / no irradiado 0 Gy) y dirección estructural de los prismas de esmalte (paralelo / oblicuo) (Figura E).

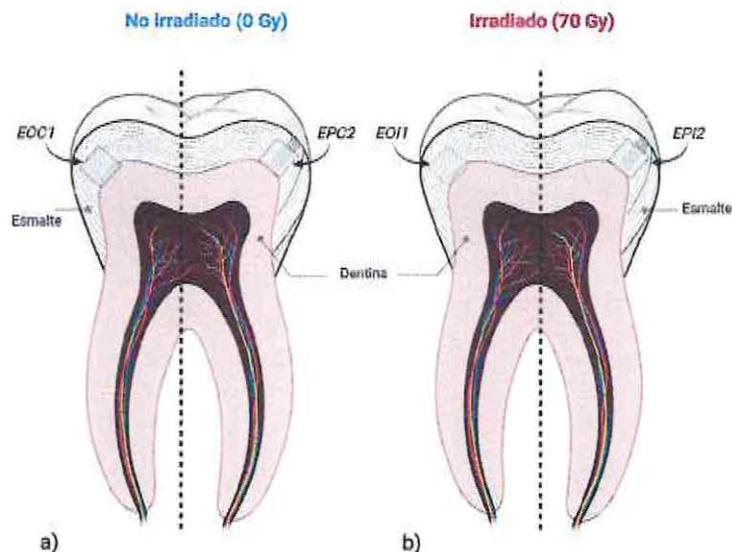


Figura E: Caracterización de la muestra: a) Diente no irradiado (0 Gy) con prismas en dirección paralelo (EPC1) dirección oblicua (EOC2) b) Diente irradiado (70 Gy) con prismas en dirección paralelo (EPI1) dirección oblicua (EOI2)

Cada uno de los terceros molares incluidos fue descongelado a temperatura ambiente en agua destilada durante 90 minutos, para realizar de manera inicial con un corte transversal a nivel de la unión ameloceamentaria de manera de eliminar la raíz del diente (Figura F: a-b), luego se realizaron cortes transversales en sentido mesio-distal de cada diente, para obtener discos de 2mm de espesor (Figura F: c-d) (ISOMET 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EE.UU). Posteriormente se obtuvieron 2 especímenes de prueba de cada uno de los discos obtenidos, específicamente de esmalte abarcando la zona de unión amelodentinaria (DEJ) mediante el corte de cubos pequeños ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) (Figura F: e) utilizando un disco de corte impregnado en diamante, bajo hidratación continua. Luego la superficie fue pulida con lija #600 (# 1500–3000 grano SiC durante 60 s) en un recipiente de vidrio con agua con movimientos circulares en sentido horario durante 30 segundos.

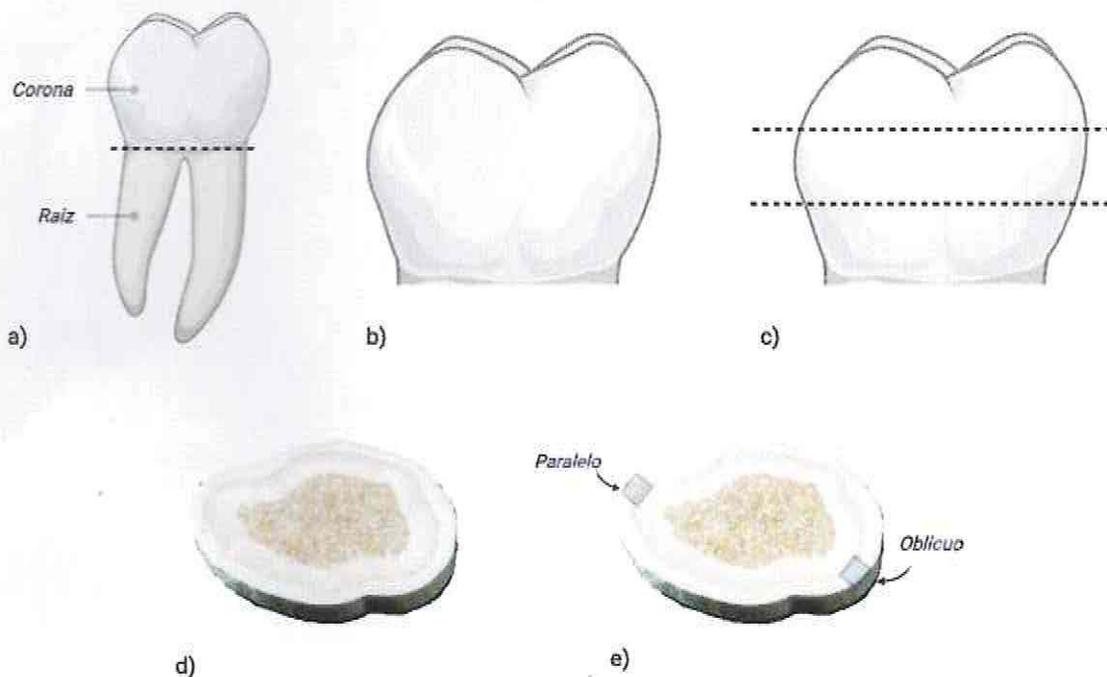


Figura F: Representación de zona de obtención de cubos de esmalte y DEJ, en corona dentaria. a) Separación de corona-raíz. b) Obtención de porción coronaria. d) corte transversal en sentido mesio-distal de corona. e) Disco obtenido de porción coronaria. f) Corte de cubos $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$.

Las muestras fueron insertadas en una matriz de resina compuesta con dimensiones de 8x6x2 mm² (Figura G), previo acondicionamiento con ácido ortofosfórico por 15 segundos, fue lavado con agua por el mismo tiempo y secado por 5 segundos con spray, luego se aplicó sistema adhesivo (Scotchbond Universal Adhesive 3M ESPE) según las instrucciones del fabricante, fotopolimerizando 40 segundos utilizando una unidad de fotopolimerización LED a 800mW / cm² (Bluephase N MC, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) por cada cara seguido de una capa hidrófoba de resina (Heliobond, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) para fotopolimerizar por 10 segundos.

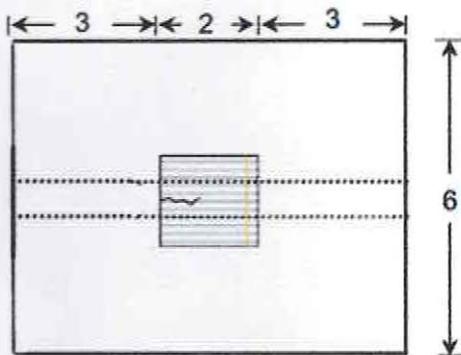


Figura G: Representación de dimensiones de matriz de resina con espécimen inserto.

Los grupos EPI1 y EPC1 fueron ubicados dentro de la matriz de resina orientando los prismas de esmalte de manera que la dirección de crecimiento de la grieta se orientó a lo largo del eje de los prismas (paralelo). Por otro lado, los grupos EOI2 y EOC2 fueron ubicados dentro de la matriz de resina orientando los prismas de esmalte de manera opuesta a la dirección de crecimiento de la grieta, estando los prismas de esmalte oblicuo a ella.

En la secuencia se realizó un canal posterior de 1mm de ancho (Figura H) para guiar la dirección de la extensión de la grieta. Se perforó dos agujeros para la aplicación de las cargas del modo de apertura como se muestra en la Figura I.

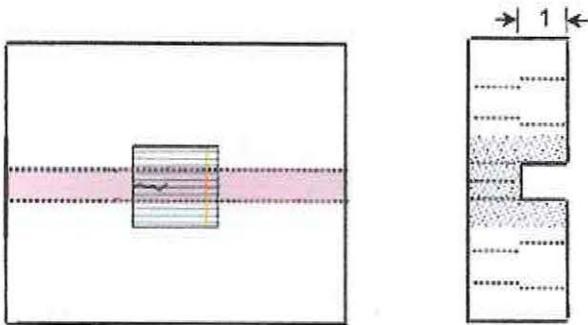


Figura H: Canal central de 1mm de ancho achurado en rojo.

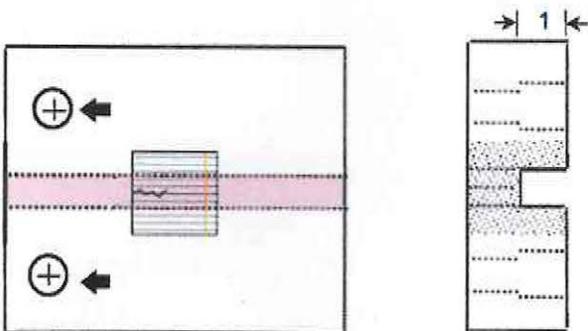


Figura I: Perforaciones indicadas con flechas.

Finalmente se introdujo una muesca de Chevron (Figura J-K), mediante un disco de diamante (0.8mm) y se afiló usando una hoja de corte (0,05 mm) impregnada en pasta de diamante (partículas de $1\mu\text{m}$) para facilitar el ingreso de la grieta (crack).

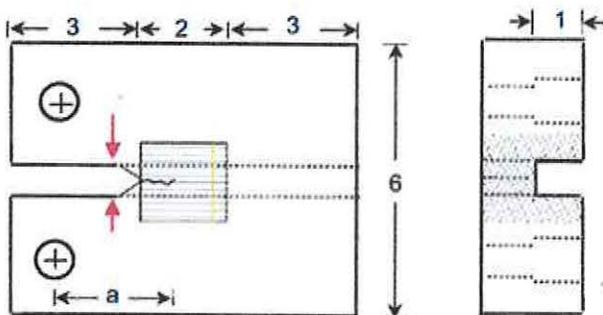


Figura J: Muesca de Chevron próxima a flechas rojas

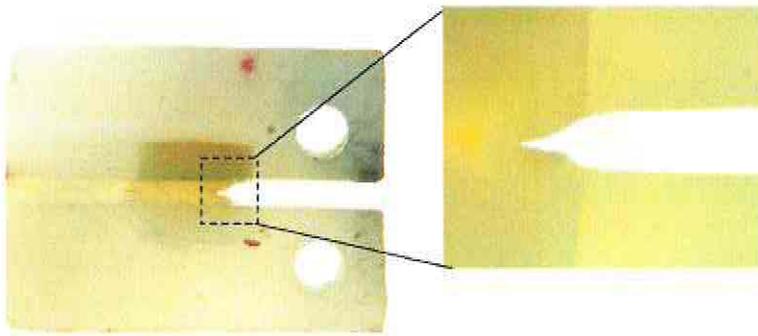


Figura K: Muestra terminada, con muesca de chevron realizada.

Todas las muestras fueron desgastadas al termino de su confección con lijas decrecientes de carbide de silicio (320 grit, 600 grit, 800 grit, 1200 grit y 3500 grit). Se finalizó con un disco de fieltro junto a una pasta de pulido de alúmina de $1.0 \mu\text{m}$ (MicroPolish II Alúmina) y $0,5 \mu\text{m}$.

7.11.2 Test de Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

Bajo donación se utilizaron terceros molares de pacientes remitidos a pabellón de Cirugía de la Facultad de Odontología UV, donde fueron extraídos por indicación terapéutica, previamente firmado el consentimiento informado. Los dientes extraídos fueron inmediatamente congelados a 20°C .

Se utilizaron un total de 6 terceros molares incluidos los cuales fueron distribuidos según la siguiente variable: Irradiación (irradiado a 70 Gy / no irradiado 0 Gy).

Cada uno de los terceros molares incluidos fue descongelado a temperatura ambiente en agua destilada durante 90 minutos.

Paralelamente fue preparada una solución de ácido ortofosfórico (SIGMA-ALDRICH) en concentración 1M, utilizando 100 ml de agua que se le adicionó 10 gr. de ácido ortofosfórico al 100% hasta formar una solución homogénea (Figura L)

Cada uno de los dientes fueron sumergidos por su porción coronaria en la solución de ácido ortofosfórico 1M durante 20,5 horas cronológicas a una humedad del 100% a 4°C (Figura K).

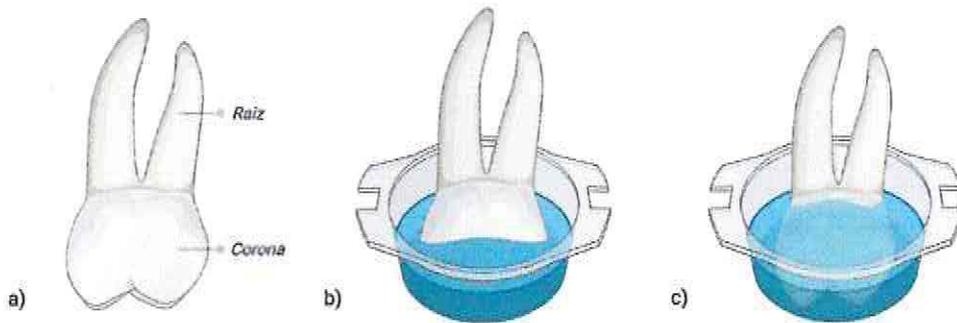


Figura L: Representación de exposición a la solución ácido ortofosfórico al 10% a 1M. a) Tercer molar. b) Introducción de la muestra a la solución. c) Sumergimiento completo de porción coronaria en solución por veinte horas y treinta minutos.

Terminado el tiempo de desmineralización (veinte horas y treinta minutos), se retiró el diente de la solución y se procedió a obtener el sobrenadante de la solución a través de un papel absorbente (Filter Paper Advantec Toyo), y con un instrumental romo se raspó la superficie coronaria del diente.

El *pool* de lectura estuvo compuesto del raspado de la superficie coronal y el sobrenadante filtrado de la solución, que fue almacenado en un tubo de eppendorf (Figura. M)

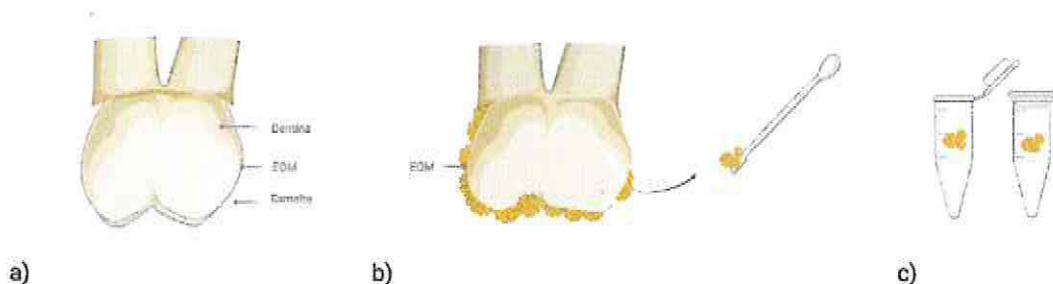


Figura M: Representación de exposición a la solución ácido ortofosfórico al 10% a 1M. a) Tercer molar parcialmente desmineralizado. b) Tercer molar completamente desmineralizado, transcurridas las 20 horas y 30 minutos. Obtención de muestra con instrumental romo. c) Almacenamiento de la muestra en tubo de eppendorf.

7.11.3 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB).

Cortes longitudinales (eje sagital) fueron obtenidos a partir de los dientes terceros molares humanos donados bajo las condiciones ya descritas. Los cortes se realizaron en la máquina de corte Isomet 1000, con disco de diamante de 0,3mm, bajo constante refrigeración, en un espesor de 0,8 mm. Posteriormente, cada corte fue sometido a desgaste por fricción con una secuencia decreciente de lijas de carbide de silicio (800 grit, 1200 grit y 3500 grit) hasta obtener cortes de espesor de 100 um. Posteriormente la superficie de los cortes fue desmineralizada parcialmente con ácido ortofosfórico al 35% por 5 segundos, seguidos de un lavado con agua destilada, para eliminar el detritus del pulido y exponer la morfología de los tejidos. Los cortes fueron posteriormente sujetos en un *stub* (porta muestra) con una cinta de carbono electro-transmisora, y llevados al Microscopio Electrónico de barrido (ESEM Thermo Scientific, modelo Quattro S) con un detector en modo concéntrico (CBS) utilizando el anillo más externo (segmento D) a un voltaje de aceleración 10KV, Distancia de Trabajo WD: 16mm.

7.12 Proceso de irradiación.

Todos los grupos fueron mantenidos bajo mismas condiciones de humedad y temperatura, aquellos grupos que fueron irradiados (EPI1 -EOI2), se transportaron en condiciones de humedad (frasco con agua), para recibir una irradiación máxima de 70 Gy, en un equipo Acelerador Lineal Dual (6-18 MV) básico con colimador 80 hojas, de la Unidad de Oncológica de Hospital Carlos Van Buren, utilizado para radioterapia, de manera de simular la dosis habitual que reciben pacientes que padecen cáncer de cabeza y cuello(50).

7.13 Análisis estadístico.

Los datos ATR-FTIR fueron analizados estadísticamente utilizando una prueba U de Mann-Whitney para detectar diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre los diferentes grupos.

Los datos de tenacidad a la fractura (K_{Ic}) se sometieron a un análisis de varianza ANOVA de dos vías (dosis de radiación versus disposición de los prismas de esmalte) y posteriormente a una prueba *post hoc* (prueba *post hoc* de Tukey $\alpha = 0.05$) para comparaciones por pares.

8. Resultados

Los valores medios obtenidos del test de Tenacidad a la fractura (K_{Ic}) para el grupo control (0 Gy) y experimental (70 Gy) se resumen en el gráfico I. Donde El comportamiento mecánico del esmalte-UAD se vio afectado por la radiación ionizante ($p=0,035$).

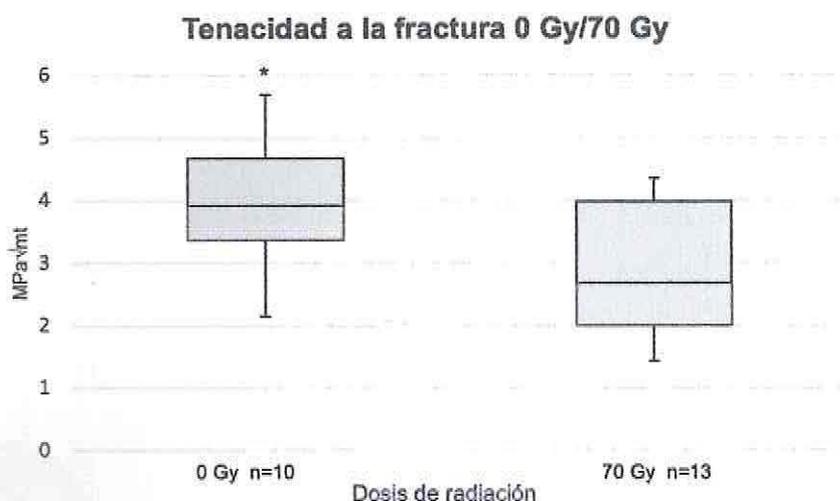


Gráfico I: Resultados al test de Tenacidad a la fractura de grupo control (0 Gy) y grupo experimental (70 Gy).

En cuanto al comportamiento del tejido según la disposición de los prismas de esmalte (oblicuo / paralelo) frente al avance de la grieta. Se observó que el tejido ofrece una menor tenacidad a la fractura cuando los prismas se encuentran paralelos a este, en comparación a la disposición oblicua ($p=0,001$) (Gráfico II). Esta disposición ofrece menor variabilidad en la K_{Ic} , independiente de la radiación ionizante ($p>0,05$).

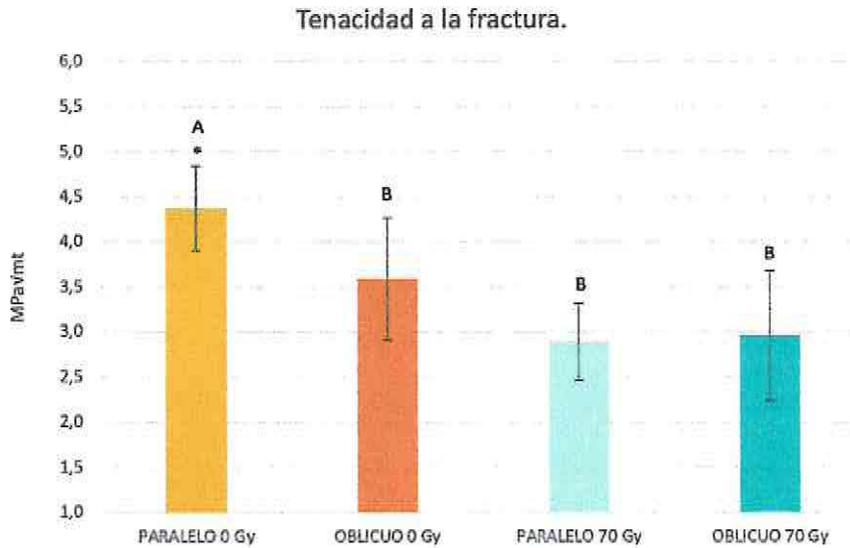


Gráfico II: Resultados del comportamiento del tejido según la disposición de los prismas de esmalte (oblicuo/ paralelo) al avance de la grieta estandarizada.

En cuanto al test de ATR-FTIR es posible observar una variación en el espectro completo del esmalte-UAD en el tejido sano (0 Gy) en comparación al tejido irradiado (70 Gy) (Gráfico III). Encontrándose bandas de absorción (Tabla 1) relacionadas a la estructura orgánica (proteínas colágenas y fosfolípidos), y estructura inorgánica (hidroxiapatita).

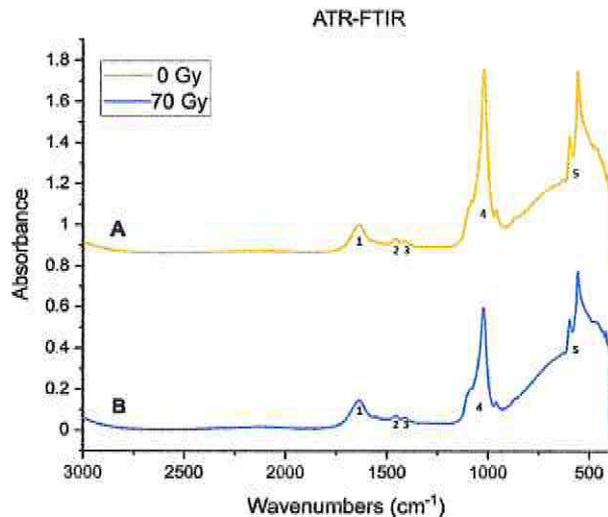


Gráfico III: ATR-FTIR de esmalte-UAD a diferentes dosis de irradiación. (A) Tejido sano 0 Gy ; B) Tejido irradiado 70 Gy. En el gráfico es posible identificar la banda de intensidad para amida I (1), amida II (2), CH₂ y CO₃ (3), y las fases de fosfato: PO₄ v3 (4) y PO₄ v1 (5).

Dentro del análisis cuantitativo de las bandas de absorción es posible observar una reducción en la razón proteína/mineral de Amida II/ $PO_4 v_1$ ($p < 0,05$); razón de Amida I/III, junto al Índice de cristalinidad (Gráfico IV). No es posible observar variaciones en cuando a la relación entre bandas 1660/1690 posterior a la radiación ionizante.

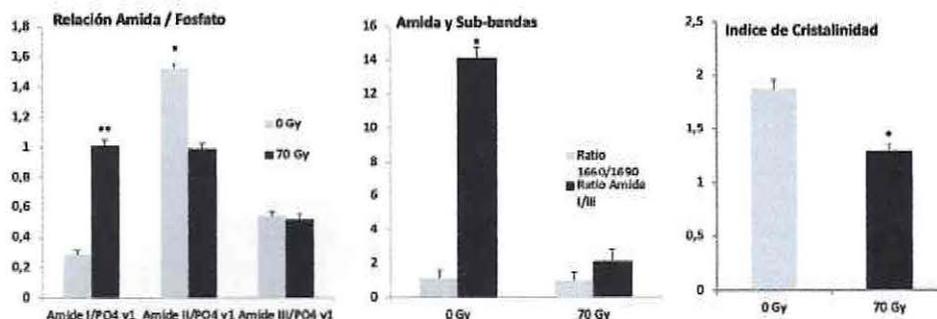


Gráfico IV: ATR-FTIR de esmalte-UAD a diferentes dosis de irradiación. Resultado del análisis de las razones de Amida I, II y III en relación al fosfato; razón entre sub-banda 1660/1690 y Amida I/III; e Índice de cristalinidad de las muestras evaluadas.

Respecto al contenido de fosfolípidos, específicamente el ácido caproico (pico 2691 cm^{-1}) disminuye significativamente ($p < 0,05$) con la radiación ionizante, aumentado el espectro completo (rango 2660-3200) de fosfolípidos posterior a ésta (Gráfico V y VI).

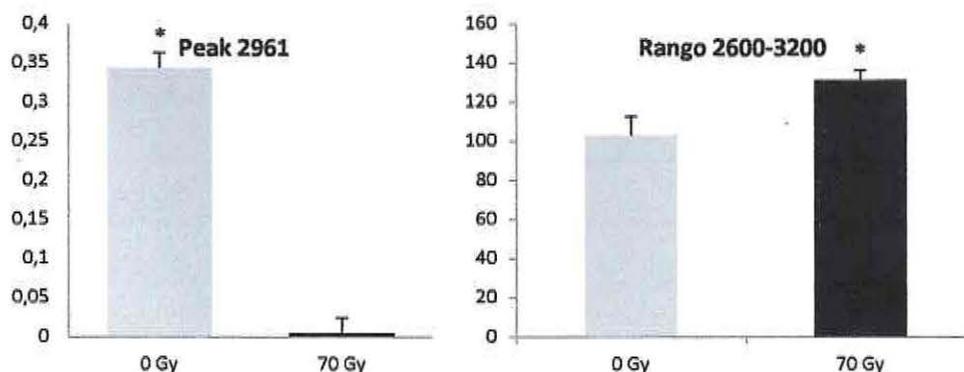


Gráfico V: ATR-FTIR de esmalte-UAD a diferentes dosis de irradiación. Resultado del análisis de los modos de vibración C-H en la zona 1 del espectro, relacionados a fosfolípidos. Ácido caproico (peak 2961) y área 2600-3200, de las muestras evaluadas.

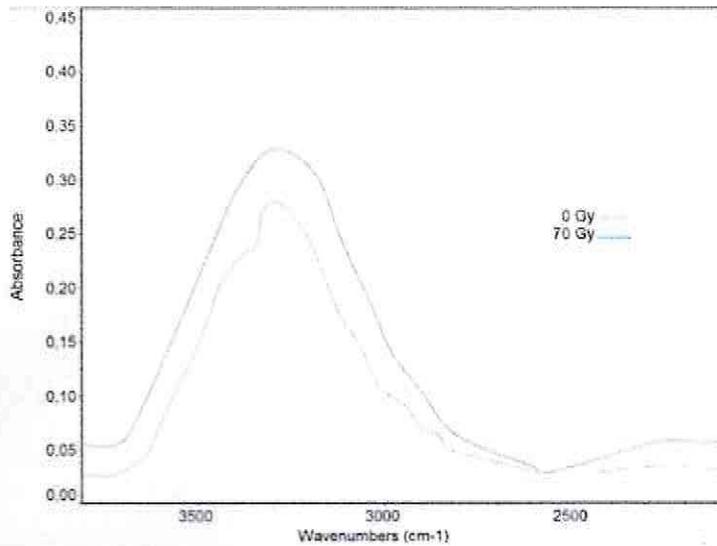


Gráfico VI: ATR-FTIR de esmalte-UAD a diferentes dosis de irradiación. Resultado del análisis de los modos de vibración C-H en la zona 1 del espectro en área de 2600-3200 cm^{-1} , de las muestras evaluadas.

Finalmente es posible observar como la estructura prismática pierde su conformación, tanto superficial como en profundidad, posterior a la radiación ionizante (Figura N), en comparación al tejido sano en la MEB.

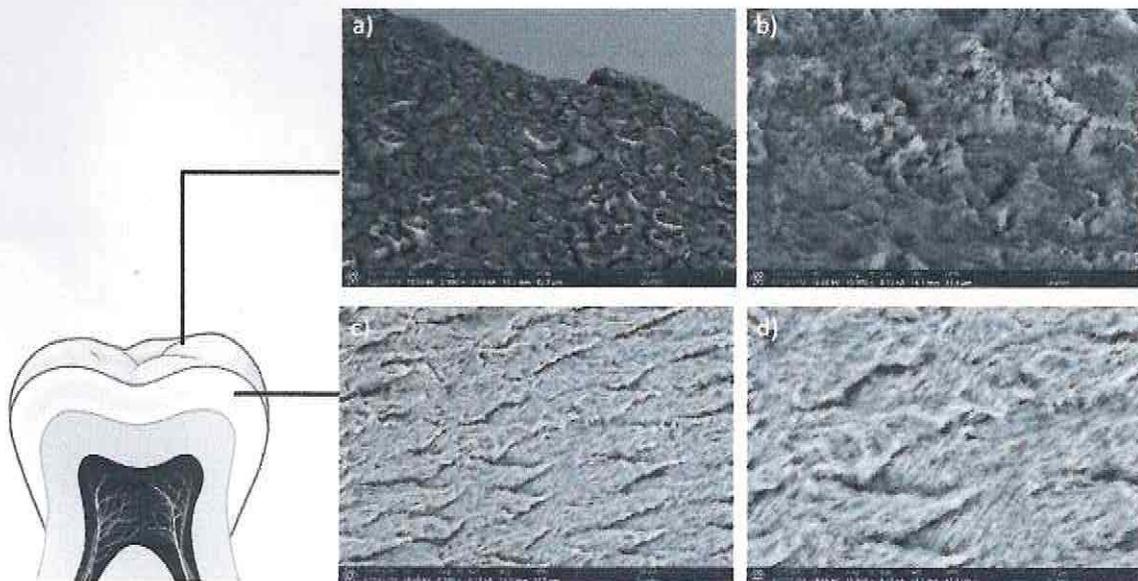


Figura N: Microscopía electrónica de barrido (MEB) de Esmalte sano (0 Gy). a) Esmalte superficial b) Amplificación de esmalte superficial; c) Esmalte interno; d) Amplificación de esmalte interno.

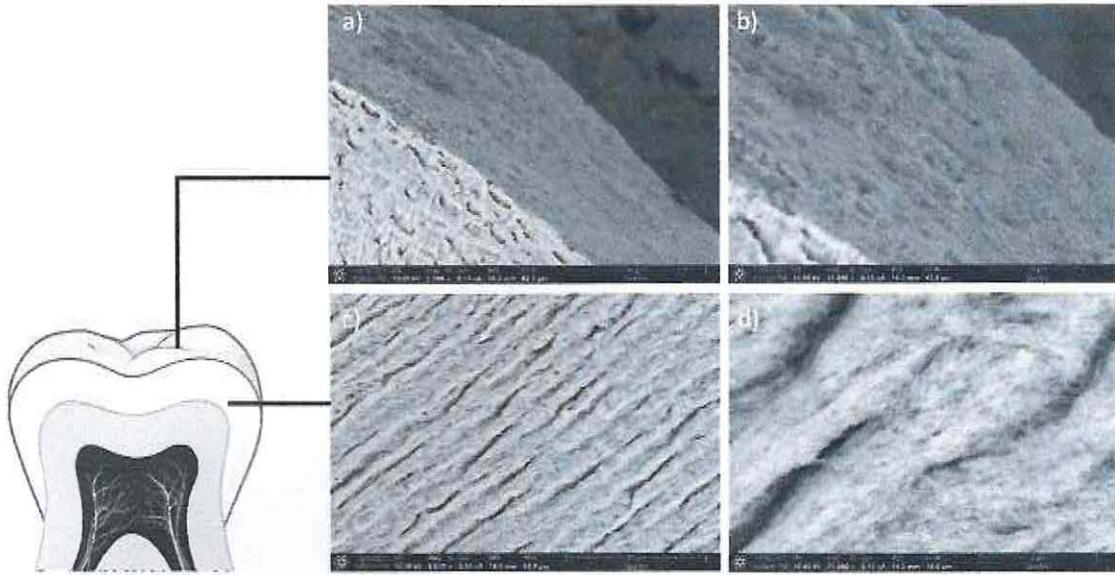


Figura Ñ: Microscopía electrónica de barrido (MEB) de esmalte irradiado (70 Gy). a) Esmalte superficial; b) Amplificación de esmalte superficial; c) Esmalte interno; d) Amplificación de esmalte interno.

9. Discusión

El presente estudio demostró que la radiación ionizante influye sobre las propiedades físico-mecánicas y ultra-estructurales del esmalte-UAD irradiado en comparación al tejido sano, por lo tanto se rechazan las hipótesis nulas planteadas. Lo anterior es explicado en base a los resultados obtenidos (Gráficos III, IV y V)- (Figuras N y Ñ) , debido a la pérdida de la tenacidad a la fractura y a los cambios ultra-estructurales que sufre el tejido con el paso de radiación ionizante. Se ha reportado alteraciones en la estructura del cristal de hidroxiapatita y una reducción significativa en su índice de cristalinidad, además de cambios en su micromorfología en la región interprismática– correspondiente a la matriz orgánica del esmalte(172, 173)- con fragmentación de las fibrillas colágenas en la medida que se incrementa la dosis de radiación(174). Lo anterior se refleja directamente en los resultados obtenidos al análisis por ATR-FTIR del presente estudio (Gráficos III, IV y V) e indirectamente en el comportamiento biomecánico observado (Gráfico I y II). Esto, se correlaciona con el efecto indirecto que tiene la radiación sobre tejidos con alto contenido de agua, donde se generan radicales libres y peróxido de hidrógeno(7, 84, 175, 176). Por tanto la zona interprismática junto a zonas con mayor proporción de proteínas colagénicas y no colagénicas como lo es la UAD, podrían ser más vulnerables y con ello repercutir de mayor manera en sus propiedades mecánicas.

Los análisis de espectroscopía del esmalte-UAD mostraron cambios significativos en la composición de proteínas y fosfolípidos que hacen parte del contenido orgánico. En condiciones fisiológicas, la zona de UAD es una estructura tridimensional compleja y crítica, que permite la unión intrincada y la transición de dos tejidos con un comportamiento biomecánico diferente(21). Esto se produce debido a la interacción del colágeno IV,VII, amelogenina y ameloblastina (Figura C)(20, 21) de la matriz orgánica del esmalte que junto al colágeno tipo I de la dentina, forman complejos multiméricos a través de esta transición(127, 146, 148), lo que permite una continuidad funcional a esta interfase(21). Sumado a lo anterior, la composición ultra-estructural va hacer de esta transición una zona particular,

encontrando altas intensidades de fosfato de calcio (cercano al esmalte) que disminuye progresivamente hacia el interior, asociándose a una menor dureza y rigidez(20), reduciéndose completamente al cruzar hacia la dentina(19); mientras que el contenido orgánico se distribuye de manera opuesta(19). Por lo que el mantenimiento de estas condiciones son necesarias para el correcto funcionamiento del tejido.

La microscopía electrónica de barrido muestra cambios morfológicos en el esmalte-UAD irradiado en comparación al tejido sano. Donde la organización jerárquica e intrincada (114, 115, 177), le otorgan a este tejido un mecanismo de endurecimiento estructural. La disposición alternada (paralelos, oblicuos y entrecruzados) de cristales de hidroxiapatita, envueltos en una vaina de matriz orgánica(120), en áreas cuspidas e incisales – fenómeno conocido como decusación(116)- es la responsable de su resistencia al crecimiento de grietas o fracturas en áreas de mayor esfuerzo masticatorio(121, 122). Ultra-estructuralmente, cada cristal o varilla de esmalte está compuesto de nanocristales (123). Estos no se encuentran coorientados, es decir, alcanzan una angulación de sus ejes C que va desde 30° hasta 90°(125). Esta disposición, provoca que una grieta o falla deba propagarse a lo largo de las interfases de los nanocristales, sufriendo deflexión a cada paso, aumentando con ello la tenacidad a la fractura del esmalte a nano escala(125). Así los resultados de este estudio muestran alteraciones en esta interfase, lo que justificaría que la energía de esta falla estandarizada tenga menor oposición debido a la alteración del contenido orgánico observado por espectroscopía, sumado a la orientación paralela de los primas de esmalte.

A pesar que en un estudios iniciales no se encontraron diferencias en la estructura del esmalte al paso de la radiación ionizante(26, 172, 178), estudios actuales sumados a éste han identificado cambios como: el acortamiento de las varillas de esmalte, su fragmentación(84) y una disposición irregular dentro del tejido(84, 178); a la vez que surgen grietas y áreas erosivas en su superficie(25,

179). Lo que podría verse reflejado en la baja tenacidad a la propagación de la falla observado en las muestras irradiadas, frente a las sanas, cuando la tenacidad a la fractura fue evaluada.

A nivel ultra-estructural los cristales de hidroxiapatita pierden su simetría, lo que se refleja en una disminución de su índice de cristalinidad(10, 17, 84), que conlleva a una pérdida de sus propiedades mecánicas inherentes a una red cristalina simétrica(180). Además de existir una disminución cuantitativa de minerales tales como iones de calcio y fosfato(84). Si bien, los valores de cristalinidad son mas bajos en la UAD, por ser menos mineralizada(181) en el presente estudio fue posible corroborar esta disminución de la cristalinidad, posterior a los 70 Gy de radiación ionizante. Así, los efectos más nocivos sobre este tejido, se han descrito a nivel de la sustancia de esmalte interprismática(84, 173, 174, 179), la cual presenta un mayor contenido orgánico que predispondría al daño en la región(182). Esto debido a que se debilitarían las conexiones entre las varillas de esmalte provocando microfisuras y una mayor rugosidad en su superficie(25, 88), perdiendo la capacidad de transferencia de estrés entre los componentes minerales otorgado por proteínas colagénicas y no colagénicas(183-185). Facilitando así el avance de las grietas alrededor o entre los primas de esmalte(186).

Esto explicaría los resultados obtenidos en el test de tenacidad a la fractura de este estudio, donde los prismas de esmalte irradiados dispuestos paralelamente al origen de la grieta artificial, opondrían menor resistencia a su avance, facilitando su paso a través de la sustancia interprismática alterada por la radiación ionizante, existiendo una mayor oposición cuando éstos se encuentran oblicuo a la falla, debido al entrecruzamiento -decusación- de sus cristales. Así, los mecanismos de endurecimiento micro y ultra-estructural se ven influenciados por la orientación del prisma(84), y por el efecto directo de la radiación ionizante sobre él.

A su vez, la matriz orgánica del esmalte, distribuida en mayor proporción hasta los 300 μm (127) desde la UAD a la superficie externa del diente, sufre el

fenómeno de descarboxilación(25) producto del paso de la radiación ionizante. Esto conlleva a la pérdida de unión electrostática entre grupos carboxilatos de las cadenas laterales del colágeno y grupos fosfato mineral de los cristales de hidroxiapatita(29, 179), reduciendo así la interacción mineral-orgánica(88).Lo anterior podría inducir la formación de microgrietas producto del dióxido de carbono generado en dicha reacción(29). Así también se afectan biomoléculas como los ácidos grasos presentes en esta matriz. Ya sea de manera indirecta a través de radicales libres generados por la radiólisis del agua(187, 188) como por efecto directo de la radiación(189). Dichos procesos son conocidos como peroxidación lipídica (LPO) afectando a los ácidos grasos insaturados(190) y la fragmentación lipídica en el caso ácidos grasos saturados(188, 189), modificando así la ultraestructura del tejido. Esto podría explicar la marcada disminución del peak 2961 cm^{-1} , asociado al ácido caproico, el cual está presente en los tejidos mineralizados, y sería susceptible a la fragmentación lipídica por el paso de longitudes de ondas de alta energía, como las generadas por la radiación ionizante(166, 191). Esta sería la primera vez que se describe la alteración de este ácido graso en el esmalte-UAD por la radiación ionizante. Este ácido participa en el proceso de fibrinólisis(165) y su alteración estaría asociada en otros tejidos con fibrosis y rigidización(192).

También el acúmulo de subproductos lipídicos posterior a dichas reacciones, conlleva a un aumento en la rigidez(5) y viscosidad del tejido(187, 193). Sumado a la aparición de enlaces cruzados no enzimáticos *-cross-linking-* intra e intermoleculares disminuyendo así su solubilidad(188). Lo anterior se relaciona con los hallazgos de ATR-FTIR del contenido orgánico del esmalte y UAD, donde existió una alteración significativa en los ácidos grasos, encontrados en el rango 2600-3200 cm^{-1} : Tribehenina (bandas fuerte $\sim 2882 \text{ cm}^{-1}$; banda débil 2846;2934 cm^{-1}), Ácido elaidico (bandas 2875 / 2880 cm^{-1}) y Tricaprina (banda 3265 cm^{-1})(191), aumentando los subproductos lipídicos posterior a la radiación ionizante. Dicho aumento provocaría una menor deformación viscoelástica por parte del tejido, comprometiendo la capacidad para disipar tensiones a través de los cristales de hidroxiapatita.

A pesar de que en estudios previos se ha identificado alteraciones en el contenido orgánico del esmalte-UAD producto de la irradiación, este rango ha sido asociado múltiples veces de manera errónea con proteínas(17, 194, 195). Sin embargo, este estudio ha logrado identificar estos ácidos grasos, y reconocer su alteración posterior a la radiación ionizante.

10. Conclusión

Dentro de las limitaciones de este estudio, es posible concluir que los cambios ultra-estructurales determinados por el contenido de ácidos grasos y proteínas del esmalte-UAD irradiados, son un factor determinante en la comprensión del comportamiento mecánico del tejido frente al avance de una grieta – tenacidad a la fractura-.

Este hallazgo, permite avanzar en la caracterización respecto al fenómeno clínico de delaminación, otorgando directrices para la realización de más estudios que indaguen y/o profundicen en este punto.

Lo anterior, favorecerá el futuro desarrollo de estrategias que brinden solución a los desafíos que representa la rehabilitación de pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

11. Referencias

1. Budach V, Tinhofer I. Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2019;20(6):e313-e26.
2. 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.
3. Alterio D, Marvaso G, Ferrari A, Volpe S, Orecchia R, Jereczek-Fossa BA. Modern radiotherapy for head and neck cancer. *Seminars in Oncology.* 2019;46(3):233-45.
4. Yeh SA. Radiotherapy for head and neck cancer. *Semin Plast Surg.* 2010;24(2):127-36.
5. Edimecheva IP, Kisel MA, Shadyro OI, Vlasov AP, Yurkova IL. The damage to phospholipids caused by free radical attack on glycerol and sphingosine backbone. *Int J Radiat Biol.* 1997;71(5):555-60.
6. Shao C, Folkard M, Michael BD, Prise KM. Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(37):13495-500.
7. Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh K-W. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in molecular biosciences.* 2014;1:24-.
8. Lalande M, Schwob L, Vizcaino V, Chirot F, Dugourd P, Schlathölter T, et al. Direct Radiation Effects on the Structure and Stability of Collagen and Other Proteins. *ChemBioChem.* 2019;20(24):2972-80.
9. Naves LZ, Novais VR, Armstrong SR, Correr-Sobrinho L, Soares CJ. Effect of gamma radiation on bonding to human enamel and dentin. *Support Care Cancer.* 2012;20(11):2873-8.
10. Munoz MA, Garin-Correa C, Gonzalez-Arriagada W, Quintela Davila X, Haberle 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.* 2020:1-9.

11. Lieshout HF, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue—a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2014;18(1):17-24.
12. 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.
13. Kielbassa AM, Hellwig E, Meyer-Lueckel H. Effects of irradiation on in situ remineralization of human and bovine enamel demineralized in vitro. *Caries Res*. 2006;40(2):130-5.
14. Kielbassa AM. In situ induced demineralization in irradiated and non-irradiated human dentin. *European Journal of Oral Sciences*. 2000;108(3):214-21.
15. Gonzalez-Arriagada WA, Santos-Silva AR, Carvalho de Andrade MA, Elias RA, MA L. Criterios de evaluacion odontológica pre-radioterapia y necesidad de tratamiento de las enfermedades orales post-radioterapia en cabeza y cuello. *International Journal of Odontostomatology*. 2010;4(3):255-66.
16. 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*. 16. India2020. p. 612-8.
17. Reed R, Xu C, Liu Y, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. *Archives of oral biology*. 2015;60(5):690-7.
18. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjaderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90(1):373-80.
19. Amel S, Fares N, Alban D, Bernard L, Frédéric JGC, Hervé T, et al. Confocal Raman mapping of collagen cross-link and crystallinity of human dentin–enamel junction. *Journal of Biomedical Optics*. 2017;22(8):1-8.
20. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Biol*. 2002;47(4):281-91.
21. Mukherjee K, Visakan G, Phark JH, Moradian-Oldak J. Enhancing Collagen Mineralization with Amelogenin Peptide: Towards the Restoration of Dentin. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(4):2251-62.

22. White SN, Paine ML, Luo W, Sarikaya M, Fong H, Yu Z, et al. The Dentino-enamel Junction is a Broad Transitional Zone Uniting Dissimilar Bioceramic Composites. *Journal of the American Ceramic Society*. 2000;83(1):238-40.
23. de Barros da Cunha SR, Ramos PA, Nesrallah AC, Parahyba CJ, Fregnani ER, Aranha AC. The Effects of Ionizing Radiation on the Oral Cavity. *J Contemp Dent Pract*. 2015;16(8):679-87.
24. 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-enamel junction: a systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(1):e96-e105.
25. El-Faramawy N, Ameen R, El-Haddad K, El-Zainy M. Effects of gamma radiation on hard dental tissues of albino rats: investigation by light microscopy. *Radiat Environ Biophys*. 2013;52(3):375-87.
26. 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.
27. Jansma J, Vissink A, Jongebloed WL, Retief DH, Johannes 's-Gravenmade E. Natural and induced radiation caries: A SEM study. *Am J Dent*. 1993;6(3):130-6.
28. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. [New evidence for the etiology of so-called radiation caries. Proof for directed radiogenic damage of the enamel-dentin junction]. *Strahlenther Onkol*. 1997;173(12):668-76.
29. Fränzel W, Gerlach R, Hein HJ, Schaller HG. Effect of tumor therapeutic irradiation on the mechanical properties of teeth tissue. *Z Med Phys*. 2006;16(2):148-54.
30. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Jr., Balooch M. The functional width of the dentino-enamel junction determined by AFM-based nanoscratching. *J Struct Biol*. 2001;135(3):294-301.
31. Rivera C. Essentials of oral cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(9):11884-94.
32. Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. *Adv Clin Chem*. 86. United States: © 2018 Elsevier Inc; 2018. p. 23-70.

33. Vinés V E, Orellana G MJ, Bravo M C, Jofré P D. Manejo del cáncer de cabeza y cuello: ¿Radioterapia a quién, cuándo y por qué? *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. 2017;77:81-90.
34. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
35. Nunez-Aguilar J, Oliveros-Lopez LG, Fernandez-Olavarria A, Torres-Lagares D, Serrera-Figallo MA, Gutierrez-Corrales A, et al. Influence of dental treatment in place on quality of life in oral cancer patients undergoing chemoradiotherapy. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 2018;23(4):e498-e505.
36. Thavarool SB, Muttath G, Nayanar S, Duraisamy K, Bhat P, Shringarpure K, et al. Improved survival among oral cancer patients: findings from a retrospective study at a tertiary care cancer centre in rural Kerala, India. *World J Surg Oncol*. 2019;17(1):15.
37. Global Burden of Disease Cancer C. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*. 2017;3(4):524-48.
38. Vallebuona C. Estimación de incidencia de cáncer para Chile 2003-2007, Santiago, Chile 2012.
39. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology*. 91. Switzerland: © 2016 S. Karger AG, Basel.; 2016. p. 13-23.
40. Panarese I, Aquino G, Ronchi A, Longo F, Montella M, Cozzolino I, et al. Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2019;19(2):105-19.
41. Huang SH, O'Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(2):e233-40.
42. Inchingolo F, Santacroce L, Ballini A, Topi S, Dipalma G, Haxhirexha K, et al. Oral Cancer: A Historical Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(9).
43. De La Fuente Ávila M, Díaz Jara M, Martínez Rondanelli B. Carcinoma espinocelular de lengua: estudio de sobrevida a 5 años. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2016;9(1):74-8.

44. Bugshan AaF, I. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research*. 2020;9(229).
45. Mathur R, Singhavi HR, Malik A, Nair S, Chaturvedi P. Role of Poor Oral Hygiene in Causation of Oral Cancer-a Review of Literature. *Indian J Surg Oncol*. 2019;10(1):184-95.
46. Rogers SN. Quality of life perspectives in patients with oral cancer. *Oral Oncol*. 2010;46(6):445-7.
47. Patrick DL, Bergner M. Measurement of health status in the 1990s. *Annu Rev Public Health*. 1990;11:165-83.
48. Petersen PE. World Health Organization global policy for improvement of oral health--World Health Assembly 2007. *Int Dent J*. 2008;58(3):115-21.
49. Muniz RM, Zago MM. The oncologic radiotherapy experience for patients: a poison-drug. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2008;16(6):998-1004.
50. Colevas AD, Sue SY, David GP, Sharon S, David A, Douglas A, et al. NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2018. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(5):479-90.
51. Wang J-S, Wang H-J, Qian H-L. Biological effects of radiation on cancer cells. *Military Medical Research*. 2018;5(1):20-.
52. Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):867-75.
53. Chen SC. Oral Dysfunction in Patients With Head and Neck Cancer: A Systematic Review. *J Nurs Res*. 2019;27(6):e58.
54. Handschel J, Sunderkötter C, Kruse-Lösler B, Prott FJ, Meyer U, Piffko J, et al. Late effects of radiotherapy on oral mucosa in humans. *Eur J Oral Sci*. 2001;109(2):95-102.
55. Grötz KA, Genitsariotis S, Vehling D, Al-Nawas B. Long-term oral Candida colonization, mucositis and salivary function after head and neck radiotherapy. *Support Care Cancer*. 2003;11(11):717-21.

56. Corvò R, Amichetti M, Ascarelli A, Arcangeli G, Buffoli A, Cellini N, et al. Effects of fluconazole in the prophylaxis of oropharyngeal candidiasis in patients undergoing radiotherapy for head and neck tumour: results from a double-blind placebo-controlled trial. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2008;17(3):270-7.
57. Sciubba JJ, Goldenberg D. Oral complications of radiotherapy. *Lancet Oncol*. 2006;7(2):175-83.
58. Miller EH, Quinn AI. Dental considerations in the management of head and neck cancer patients. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006;39(2):319-29.
59. Jham BC, da Silva Freire AR. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(5):704-8.
60. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(3):199-212.
61. Abed S, Khoury C, Morand JJ. Radiodermatitis. *EMC - Dermatología*. 2016;50(4):1-9.
62. Seité S, Bensadoun R-J, Mazer J-M. Prevention and treatment of acute and chronic radiodermatitis. *Breast cancer (Dove Medical Press)*. 2017;9:551-7.
63. Hancock PJ, Epstein JB, Sadler GR. Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. *J Can Dent Assoc*. 2003;69(9):585-90.
64. Ramirez-Amador V, Silverman S, Jr., Mayer P, Tyler M, Quivey J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84(2):149-53.
65. Clavé P, Arreola V, Velasco M, Quer M, Castellví JM, Almirall J, et al. Diagnóstico y tratamiento de la disfagia orofaríngea funcional. Aspectos de interés para el cirujano digestivo. *Cirugía Española*. 2007;82(2):62-76.
66. Nguyen NP, Moltz CC, Frank C, Vos P, Smith HJ, Karlsson U, et al. Dysphagia following chemoradiation for locally advanced head and neck cancer. *Ann Oncol*. 2004;15(3):383-8.
67. Ohm KE, Wahlin YB, Sjöden PO. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. *Support Care Cancer*. 2001;9(4):247-57.

68. Herrera Herrera A, Díaz Caballero A, Herrera Barrios F, Fang Mercado LC. Osteorradionecrosis como secuela de la radioterapia. *Avances en Odontoestomatología*. 2012;28:175-80.
69. Jensen S, Pedersen A, Reibel J, Nauntofte B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Supportive Care in Cancer*. 2003;11(4):207-25.
70. Jensen SB, Vissink A, Limesand KH, Reyland ME. Salivary Gland Hypofunction and Xerostomia in Head and Neck Radiation Patients. *JNCI Monographs*. 2019;2019(53).
71. Langendijk JA, Doornaert P, Leeuw IMV-d, Leemans CR, Aaronson NK, Slotman BJ. Impact of Late Treatment-Related Toxicity on Quality of Life Among Patients With Head and Neck Cancer Treated With Radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(22):3770-6.
72. Dawes C, Pedersen AML, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*. 2015;60(6):863-74.
73. Murdoch-Kinch C-A, Kim HM, Vineberg KA, Ship JA, Eisbruch A. Dose-effect relationships for the submandibular salivary glands and implications for their sparing by intensity modulated radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;72(2):373-82.
74. Dijkema T, Raaijmakers CPJ, Ten Haken RK, Roesink JM, Braam PM, Houweling AC, et al. Parotid gland function after radiotherapy: the combined michigan and utrecht experience. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2010;78(2):449-53.
75. Jensen SB, Pedersen AML, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Supportive Care in Cancer*. 2010;18(8):1039-60.
76. Burlage FR, Coppes RP, Meertens H, Stokman MA, Vissink A. Parotid and submandibular/sublingual salivary flow during high dose radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*. 2001;61(3):271-4.
77. Knox SM, Lombaert IMA, Haddox CL, Abrams SR, Cotrim A, Wilson AJ, et al. Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nature communications*. 2013;4:1494-.

78. Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH. Acute and late radiation injury in rhesus monkey parotid glands. Evidence of interphase cell death. *The American journal of pathology*. 1986;124(3):469-78.
79. Stephens LC, Schultheiss TE, Price RE, Ang KK, Peters LJ. Radiation apoptosis of serous acinar cells of salivary and lacrimal glands. *Cancer*. 1991;67(6):1539-43.
80. Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virchows Archiv B*. 1984;45(1):443.
81. Nagler RM, Laufer D. Protection against irradiation-induced damage to salivary glands by adrenergic agonist administration. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. 1998;40(2):477-81.
82. Frank RM, Herdly J, Philippe E. Acquired dental defects and salivary gland lesions after irradiation for carcinoma. *The Journal of the American Dental Association*. 1965;70(4):868-83.
83. Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH. Unique radiosensitivity of serous cells in rhesus monkey submandibular glands. *The American journal of pathology*. 1986;124(3):479-87.
84. Lu H, Zhao Q, Guo J, Zeng B, Yu X, Yu D, et al. Direct radiation-induced effects on dental hard tissue. *Radiation Oncology*. 2019;14(1):5.
85. Walker MP, Wichman B, Cheng AL, Coster J, Williams KB. Impact of Radiotherapy Dose on Dentition Breakdown in Head and Neck Cancer Patients. *Pract Radiat Oncol*. 2011;1(3):142-8.
86. 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 Oncology*. 2020;100:104484.
87. Gellrich NC, Schramm A, Böckmann R, Kugler J. Follow-up in patients with oral cancer. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60(4):380-6; discussion 7-8.
88. Knychalska-Karwan Z, Pawlicki R, Karwan T. Structural and microanalytical changes in dentition after radiotherapy applied in cases of tumour in the oral cavity region. *Folia Histochem Cytobiol*. 1988;26(1):25-32.

89. Kielbassa AM, Munz I, Bruggmoser G, Schulte-Mönting J. Effect of demineralization and remineralization on microhardness of irradiated dentin. *J Clin Dent*. 2002;13(3):104-10.
90. Marsh PD. In *Sickness and in Health-What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective*. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):60-5.
91. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994;8(2):263-71.
92. Schwendicke F, Splieth C, Breschi L, Banerjee A, Fontana M, Paris S, et al. When to intervene in the caries process? An expert Delphi consensus statement. *Clin Oral Investig*. 2019;23(10):3691-703.
93. Zhan L. Rebalancing the Caries Microbiome Dysbiosis: Targeted Treatment and Sugar Alcohols. *Advances in dental research*. 2018;29(1):110-6.
94. Vieira AR, Gibson CW, Deeley K, Xue H, Li Y. Weaker dental enamel explains dental decay. *PloS one*. 2015;10(4):e0124236-e.
95. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc*. 2003;69(11):722-4.
96. Weber M, Bogstad Søvik J, Mulic A, Deeley K, Tveit AB, Forella J, et al. Redefining the Phenotype of Dental Caries. *Caries research*. 2018;52(4):263-71.
97. Dirix P, Nuyts S, Van den Bogaert W. Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: a literature review. *Cancer*. 2006;107(11):2525-34.
98. 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.
99. Silva AR, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. *Caries Res*. 2009;43(1):43-9.
100. Dreizen S, Daly TE, Drane JB, Brown LR. Oral complications of cancer radiotherapy. *Postgrad Med*. 1977;61(2):85-92.

101. Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(10):1088-93; discussion 93-5.
102. Marshall S. Pathology of the hard dental tissues. *British Dental Journal*. 2013;215(7):371-2.
103. Irfan M, Delgado RZR, Frias-Lopez J. The Oral Microbiome and Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:2720.
104. Touchefeu Y, Montassier E, Nieman K, Gastinne T, Potel G, Bruley des Varannes S, et al. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis – current evidence and potential clinical applications. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2014;40(5):409-21.
105. Tuominen H, Rautava J. Oral Microbiota and Cancer Development. *Pathobiology*. 2021;88(2):116-26.
106. Vanhoecke B, De Ryck T, Stringer A, Van de Wiele T, Keefe D. Microbiota and their role in the pathogenesis of oral mucositis. *Oral Diseases*. 2015;21(1):17-30.
107. Mougeot J-LC, Stevens CB, Almon KG, Paster BJ, Lalla RV, Brennan MT, et al. Caries-associated oral microbiome in head and neck cancer radiation patients: a longitudinal study. *Journal of oral microbiology*. 2019;11(1):1586421-.
108. Sami A, Elimairi I, Stanton C, Ross RP, Ryan CA. The Role of the Microbiome in Oral Squamous Cell Carcinoma with Insight into the Microbiome–Treatment Axis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21).
109. Guobis Ž, Kareivienė V, Basevičienė N, Paipalienė P, Niedzelskienė I, Sabalys G, et al. Microflora of the oral cavity in patients with xerostomia. *Medicina (Kaunas)*. 2011;47(12):646-51.
110. Almståhl A, Wikström M, Fagerberg-Mohlin B. Microflora in oral ecosystems in subjects with radiation-induced hyposalivation. *Oral Diseases*. 2008;14(6):541-9.
111. Hou J, Zheng H, Li P, Liu H, Zhou H, Yang X. Distinct shifts in the oral microbiota are associated with the progression and aggravation of mucositis during radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*. 2018;129(1):44-51.

112. Belazi M, Velegraki A, Koussidou-Eremondi T, Andreadis D, Hini S, Arsenis G, et al. Oral Candida isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiology and Immunology*. 2004;19(6):347-51.
113. Tong HC, Gao XJ, Dong XZ. Non-Mutans Streptococci in Patients Receiving Radiotherapy in the Head and Neck Area. *Caries Research*. 2003;37(4):261-6.
114. White SN, Luo W, Paine ML, Fong H, Sarikaya M, Snead ML. Biological organization of hydroxyapatite crystallites into a fibrous continuum toughens and controls anisotropy in human enamel. *J Dent Res*. 2001;80(1):321-6.
115. He LH, Swain MV. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2008;1(1):18-29.
116. Chapter 2 - The Oral Environment. In: Sakaguchi RL, Powers JM, editors. *Craig's Restorative Dental Materials (Thirteenth Edition)*. Saint Louis: Mosby; 2012. p. 5-23.
117. Lynnerup N, Klaus HD. Chapter 4 - Fundamentals of Human Bone and Dental Biology: Structure, Function, and Development. In: Buikstra JE, editor. *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2019. p. 35-58.
118. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix. *Journal of Structural Biology*. 1999;126(3):270-99.
119. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Jr., Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Biol*. 2001;46(2):173-83.
120. Nanci A. *Ten Cate's oral histology : development, structure, and function*. 9th edition. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018. vi, 344 pages p.
121. Bajaj D, Arola DD. On the R-curve behavior of human tooth enamel. *Biomaterials*. 2009;30(23-24):4037-46.
122. Chai H, Lee JJW, Constantino PJ, Lucas PW, Lawn BR. Remarkable resilience of teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(18):7289.

123. Nysten MU, Eanes ED, Omnell KA. Crystal growth in rat enamel. *J Cell Biol.* 1963;18(1):109-23.
124. Daculsi G, Kerebel B. High-resolution electron microscope study of human enamel crystallites: Size, shape, and growth. *Journal of Ultrastructure Research.* 1978;65(2):163-72.
125. Beniash E, Stiffler CA, Sun C-Y, Jung GS, Qin Z, Buehler MJ, et al. The hidden structure of human enamel. *Nature Communications.* 2019;10(1):4383.
126. Weng ZY, Liu ZQ, Ritchie RO, Jiao D, Li DS, Wu HL, et al. Giant panda's tooth enamel: Structure, mechanical behavior and toughening mechanisms under indentation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;64:125-38.
127. McGuire JD, Walker MP, Dusevich V, Wang Y, Gorski JP. Enamel organic matrix: potential structural role in enamel and relationship to residual basement membrane constituents at the dentin enamel junction. *Connect Tissue Res.* 2014;55 Suppl 1(0 1):33-7.
128. Jäger M, Ergang P, Pataridis S, Kolrosová M, Bartoš M, Mikšík I. Proteomic analysis of dentin-enamel junction and adjacent protein-containing enamel matrix layer of healthy human molar teeth. *Eur J Oral Sci.* 2019;127(2):112-21.
129. Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):441-9.
130. Gil-Bona A, Bidlack FB. Tooth Enamel and Its Dynamic Protein Matrix. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(12).
131. Dessombz A, Lignon G, Picaut L, Rouzière S, Berdal A. Mineral studies in enamel, an exemplary model system at the interface between physics, chemistry and medical sciences. *Comptes Rendus Chimie.* 2016;19(11):1656-64.
132. Castiblanco GA, Rutishauser D, Ilag LL, Martignon S, Castellanos JE, Mejía W. Identification of proteins from human permanent erupted enamel. *European Journal of Oral Sciences.* 2015;123(6):390-5.
133. Cloitre T, Panayotov IV, Tassery H, Gergely C, Levallois B, Cuisinier FJG. Multiphoton imaging of the dentine-enamel junction. *Journal of Biophotonics.* 2013;6(4):330-7.

134. Vidal CMP, Leme AA, Aguiar TR, Phansalkar R, Nam J-W, Bisson J, et al. Mimicking the hierarchical functions of dentin collagen cross-links with plant derived phenols and phenolic acids. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2014;30(49):14887-93.
135. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med*. 2003;348(25):2543-56.
136. Birk DE, Brückner P, editors. *Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly* 2011.
137. Fratz P, editor. *Collagen structure and mechanics*: Springer Science+Business Media, LLC; 2008.
138. Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(17):2879-95.
139. Gordon MK, Hahn RA. *Collagens*. *Cell and Tissue Research*. 2009;339(1):247.
140. Kielty CM, Grant ME. *The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix*. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders* 2002. p. 159-221.
141. Brittingham R, Uitto J, Fertala A. High-affinity binding of the NC1 domain of collagen VII to laminin 5 and collagen IV. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(3):692-9.
142. Kitch FW, Raines RT. Self-assembly of synthetic collagen triple helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(9):3028-33.
143. Imbeni V, Kruzic J, Fau - Marshall GW, Marshall Gw Fau - Marshall SJ, Marshall Sj Fau - Ritchie RO, Ritchie RO. The dentin-enamel junction and the fracture of human teeth. (1476-1122 (Print)).
144. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;3:711-35.
145. Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, Jeanny JC, Jonet L, et al. The dentino-enamel junction revisited. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):482-9.

146. McGuire JD, Gorski JP, Dusevich V, Wang Y, Walker MP. Type IV collagen is a novel DEJ biomarker that is reduced by radiotherapy. *J Dent Res.* 2014;93(10):1028-34.
147. Lin CP, Douglas WH, Erlandsen SL. Scanning electron microscopy of type I collagen at the dentin-enamel junction of human teeth. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(3):381-8.
148. McGuire JD, Walker MP, Mousa A, Wang Y, Gorski JP. Type VII collagen is enriched in the enamel organic matrix associated with the dentin-enamel junction of mature human teeth. *Bone.* 2014;63:29-35.
149. Lin CP, Douglas WH. Structure-property relations and crack resistance at the bovine dentin-enamel junction. *J Dent Res.* 1994;73(5):1072-8.
150. Ylönen R, Kyrölähti T, Sund M, Ilves M, Lehenkari P, Tuukkanen J, et al. Type XIII collagen strongly affects bone formation in transgenic mice. *J Bone Miner Res.* 2005;20(8):1381-93.
151. Gómez de Ferraris MaE. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental.* 3a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009. 454 p. p.
152. Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997;25(6):441-58.
153. Bertassoni LE, Stankoska K, Swain MV. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. *Micron.* 2012;43(2):229-36.
154. Gómez de Ferrari ME. *Histología, Embriología E Ingeniería Tisular Bucodental.* 3ra ed 2009.
155. Linde A, Robins SP. Quantitative assessment of collagen crosslinks in dissected predentin and dentin. *Coll Relat Res.* 1988;8(5):443-50.
156. Buchaille R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells. *Matrix Biology.* 2000;19(5):421-30.
157. Boskey AL. The Role of Extracellular Matrix Components in Dentin Mineralization. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 1991;2(3):369-87.

158. Bertassoni LE, Orgel JPR, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta biomaterialia*. 2012;8(7):2419-33.
159. Paine ML, White SN, Luo W, Fong H, Sarikaya M, Snead ML. Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. *Matrix Biol*. 2001;20(5-6):273-92.
160. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978.
161. Forien J-B, Fleck C, Cloetens P, Duda G, Fratzi P, Zolotoyabko E, et al. Compressive Residual Strains in Mineral Nanoparticles as a Possible Origin of Enhanced Crack Resistance in Human Tooth Dentin. *Nano Letters*. 2015;15(6):3729-34.
162. Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The Importance of Intrafibrillar Mineralization of Collagen on the Mechanical Properties of Dentin. *Journal of Dental Research*. 2003;82(12):957-61.
163. Nishitani Y, Yoshiyama M, Tay FR, Wadgaonkar B, Waller J, Agee K, et al. Tensile Strength of Mineralized/Demineralized Human Normal and Carious Dentin. *Journal of Dental Research*. 2005;84(11):1075-8.
164. Perdigão J, Sezinando A, Muñoz MA, Luque-Martinez IV, Loguercio AD. Prefabricated veneers - bond strengths and ultramorphological analyses. *J Adhes Dent*. 2014;16(2):137-46.
165. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 564, Aminocaproic acid; [cited 2022 Jan. 4]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminocaproic-acid>.
166. Rozenberg M, Shoham G. FTIR spectra of solid poly-L-lysine in the stretching NH mode range. *Biophys Chem*. 125. Netherlands2007. p. 166-71.
167. Aravena P. Investigación en odontología: Pregunta, búsqueda de información y diseño de estudios. *Journal of Oral Research*; Vol 1 No 2. 2012.
168. R F, S F. Epidemiología Clínica. 4ta Edición, Barcelona España ed. Wilkins. ELW, editor2007.

169. Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater.* 2010;26(2):e100-21.
170. Paffenbarger GC, Tesk JA, Brown WE. Dental research at the National Bureau of Standards: how it changed the practice of dental health service. *J Am Dent Assoc.* 1985;111(1):83-9.
171. Kelly JR, Benetti P, Rungruanganunt P, Bona AD. The slippery slope: critical perspectives on in vitro research methodologies. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials.* 2012;28(1):41-51.
172. Zach GA. X-ray diffraction and calcium-phosphorous analysis of irradiated human teeth. *J Dent Res.* 1976;55(5):907-9.
173. Jansma J, Buskes JA, Vissink A, Mehta DM, Gravenmade EJ. The effect of X-ray irradiation on the demineralization of bovine dental enamel. A constant composition study. *Caries Res.* 1988;22(4):199-203.
174. 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.
175. Pioch T, Golfels D, Staehle HJ. An experimental study of the stability of irradiated teeth in the region of the dentinoenamel junction. *Endod Dent Traumatol.* 1992;8(6):241-4.
176. 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;20(1):242.
177. Meyers MA, Lin AY, Chen PY, Muyco J. Mechanical strength of abalone nacre: role of the soft organic layer. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008;1(1):76-85.
178. Madrid CC, de Pauli Paglioni M, Line SR, Vasconcelos KG, Brandao 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):119-28.
179. El-Faramawy N, Ameen R, El-Haddad K, Maghraby A, El-Zainy M. Effects of gamma radiation on hard dental tissues of albino rats using scanning electron microscope – Part 1. *Radiation Effects and Defects in Solids.* 2011;166(12):927-34.

180. Smith CS. Macroscopic Symmetry and Properties of Crystals. *Journal of Physics C: Solid State Physics*. 1958;6:175-249.
181. Kolmas J, Kalinowski E, Wojtowicz A, Kolodziejski W. Mid-infrared reflectance microspectroscopy of human molars: Chemical comparison of the dentin–enamel junction with the adjacent tissues. *Journal of Molecular Structure*. 2010;966(1):113-21.
182. Cole T, Silver AH. Production of Hydrogen Atoms in Teeth by X-irradiation. *Nature*. 1963;200(4907):700-1.
183. Fantner GE, Hassenkam T, Kindt JH, Weaver JC, Birkedal H, Pechenik L, et al. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat Mater*. 2005;4(8):612-6.
184. Fantner GE, Oroudjev E, Schitter G, Golde LS, Thurner P, Finch MM, et al. Sacrificial bonds and hidden length: unraveling molecular mesostructures in tough materials. *Biophys J*. 2006;90(4):1411-8.
185. Nanci AC, A R (Arnold Richard) Oral histology. Ten Cate's oral histology : development, structure, and function. United States: St. Louis, Mo. : Mosby Elsevier, c2008.; 2008.
186. Thiagarajan G, Vizcarra B, Bodapudi V, Reed R, Seyedmahmoud R, Wang Y, et al. Stress analysis of irradiated human tooth enamel using finite element methods. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 2017;20(14):1533-42.
187. Taha S, Abdelrahman AA, El shazly RM, Gaber Mh, Kany AM. Biophysical Studies on the Effect of Gamma Rays on Liposomes. *Egyptian Journal of Biomedical Engineering and Biophysics*. 2018;19(1):25-31.
188. Shadyro OI, Yurkova IL, Kisel MA. Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *Int J Radiat Biol*. 2002;78(3):211-7.
189. Shadyro OI, Yurkova IL, Kisel MA, Brede O, Arnhold J. Radiation-induced fragmentation of cardiolipin in a model membrane. *Int J Radiat Biol*. 2004;80(3):239-45.
190. Mead JF. The Irradiation-Induced Autoxidation of Linoleic Acid. *Science*. 1952;115(2991):470-2.

191. Czamara K, Majzner K, Pacia MZ, Kochan K, Kaczor A, Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2015;46(1):4-20.
192. Straub JM, New J, Hamilton CD, Lominska C, Shnayder Y, Thomas SM. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2015;141(11):1985-94.
193. Taha S, Abdelrahman A, El Shazly R, Gaber M, Kany A. Effect of direct and indirect ionizing radiation on lipid bilayer membrane. *Egyptian Journal of Biomedical Engineering and Biophysics*. 2018.
194. Dusevich V, Xu C, Wang Y, Walker MP, Gorski JP. Identification of a protein-containing enamel matrix layer which bridges with the dentine-enamel junction of adult human teeth. *Arch Oral Biol*. 2012;57(12):1585-94.
195. Al-Obaidi R, Salehi H, Collart-Dutilleul PY, Jacquot B, Tassery H, Cuisinier FJG, et al. Relationship between Changes in Chemical Composition of Enamel Subsurface Lesions and the Emitted Nonlinear Optical Signals: An in vitro Study. *Caries Res*. 2020;54(2):144-53.
196. Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol*. 47. England2008. p. 809-24.