

# UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

BRUNA LARISSA LAGO SILVA

# EFEITOS DO DIABETES MELLITUS TIPO 1 SOBRE A FORMAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO

Vitória da Conquista/BA 2017

# BRUNA LARISSA LAGO SILVA

# EFEITOS DO DIABETES MELLITUS TIPO 1 SOBRE A FORMAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

> Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ribeiro do Espírito Santo Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista/BA 2017

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

| Silva, Bruna Larissa Lago<br>Efeitos do Diabetes Mellitus tipo 1 sobre a formação do esmalte dentá<br>Larissa Lago Silva 2017.<br>54 f.: il.   | rio / Bruna             |
|--|-------------------------|
| Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ribeiro do Espírito Santo.<br>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Mul<br>em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência, 2017.  | tidisciplinar           |
| <ol> <li>Diabetes Mellitus. 2. Esmalte Dentário. 3. Amelogênese. I. Universio<br/>da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Espírito Santo, Al-<br/>Ribeiro do. III. Título.</li> </ol> | lade Federal<br>exandre |
| CDU: 616.379   | -008.64                 |
|  |                         |
|  |                         |

# **BRUNA LARISSA LAGO SILVA**

# "Efeitos do *diabetes mellitus* tipo 1 sobre a formação do esmalte dentário"

12

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOCIÊNCIAS E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, 25/04/2017.

PROF.º DR.º ALEXANDRE RIBEIRO DO ESPÍRITO SANTO (ORIENTADOR)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA** 

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> MAÍSE MENDONÇA AMÓRIM (EXAMINADORA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

PROF.º DR.º MÁRCIO CAJÁZEIRA AGUIAR (EXAMINADOR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e cuidar de mim na jornada de busca da realização dos meus sonhos.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Ribeiro do Espírito Santo**, meu orientador, agradeço pela dedicação e generosidade em compartilhar seus conhecimentos e experiências, além dos seus exemplos diários, tornando-me uma profissional com maior com maturidade científica.

Agradeço ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line**, pela dedicação e conhecimento compartilhado. Sua ajuda foi essencial e imprescindível para a conclusão do meu projeto.

À **Profa. Dra. Maria das Graças Farias Pinto,** por disponibilizar instalações e material do biotério da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Aos professores **Dr. Márcio Cajazeira Aguiar** e **Dra. Deise Souza Vilas Bôas**, agradeço pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade.

Sou grata a **Ana Prates Soares**, por todo o incentivo e pela disponibilidade durante o processo de experimentação. Foi imprescindível o seu apoio.

Aos colegas do Mestrado em Biociências por compartilharmos momentos de grande aprendizado e descontração.

Meus agradecimentos aos amigos **Dandara Andrade** e **Gladstone Messias**, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Aos alunos da UFBA que me permitiram aprender mais do que ensinar durante o tirocínio à docência nas disciplinas de Histologia Médica do Departamento de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde em Salvador/BA.

Ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, pela prestigiosa oportunidade do Programa de Pós-Graduação em Biociências.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e ao Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, pelo acolhimento e por ceder seus laboratórios para a realização dos meus experimentos. Foi minha casa durante o processo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, pelo conhecimento e experiência adquiridos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro e investimento.

Aos meus pais, **Luciana Lago** e **Sérgio Gomes**, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu padrinho **Jaildon Jorge**, pela força e carinho durante toda esta longa caminhada.

A **Lukas Alberty**, pelo companheirismo, pela paciência nas horas em que estive ausente, pelo incentivo, e principalmente pelo carinho.

A minhas amigas **Dandara Santos** e **Verônica Santos**, pelo estímulo e por nunca me permitirem desanimar.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado. Valeu a pena toda distância, todo sofrimento, todas as renúncias. Hoje estamos colhendo, juntos, os frutos do nosso empenho!

"Não tenha medo do caminho, tenha medo de não caminhar." Augusto Cury

### RESUMO

SILVA, Bruna Larissa Lago. Efeitos do Diabetes Mellitus tipo 1 Sobre a Formação do Esmalte Dentário. 54 f. il. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

O objetivo deste trabalho foi investigar birrefringência e morfologia da matriz orgânica do esmalte na fase de secreção da amelogênese (MOES) e propriedades mecânicas e estruturais do esmalte maduro de incisivos superiores de ratos adultos mantidos vivos por um período de 56 dias após indução de diabetes mellitus tipo 1 experimental (DMT1) com injeção única de estreptozotocina (60 mg/Kg), utilizando-se microscopias de luz de campo claro e polarizada (MLCC e MLP), espectrometria de energia dispersiva de raios x (EEDRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teste de microdureza. MLCC e MLP mostraram discretas alterações estruturais e pequena redução nos valores de retardo ótico do brilho de birrefringência da MOES em ratos diabéticos comparados aos controles (p > 0,05). EEDRX demonstrou que DMT1 experimental induziu pequenos aumentos estatisticamente significativos das quantidades de cálcio e fósforo na superfície externa do esmalte maduro (p < 0,01) com preservação da razão cálcio/fósforo naquela estrutura (p > 0,05). DMT1 experimental causou importantes alterações ultraestruturais no esmalte maduro reveladas por meio de MEV, e induziu uma redução estatisticamente significante de aproximadamente 13,67 % em sua microdureza à 80  $\mu$ m de distância da junção amelodentinária (p < 0,01). O presente estudo indica que a DMT1 pode afetar o desenvolvimento do esmalte, levando a alterações das propriedades ultraestruturais e mecânicas do esmalte maduro, que podem aumentar a susceptibilidade a cáries.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus Tipo 1; Amelogênese; Matriz Orgânica do Esmalte Dentário; Esmalte Dentário; Microscopia de Luz; Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X; Microscopia Eletrônica de Varredura; Teste de Microdureza.

### ABSTRACT

The aim of the present work was to investigate birefringence and morphology of the secretory stage enamel organic extracellular matrix (EOECM), and structural and mechanical properties of mature enamel of upper incisors from adult rats that had been maintained alive for a period of 56 days after the induction of type 1 diabetes mellitus (T1DM) with a single dose of streptozotocin (60 mg/kg), using transmitted polarizing and bright field light microscopies (TPLM and BFLM), energy-dispersive x-ray (EDX) analysis, scanning electron microscopy (SEM) and microhardness testing. BFLM and TPLM showed slight morphological changes and little reduction in optical retardation values of birefringence brightness of the secretory stage EOECM in diabetic rats when compared to control animals (p > 0.05). EDX analysis showed that experimental T1DM induced statistically significant little increases in the amount of calcium and phosphorus in outer mature enamel (p < 0.01) with preservation of calcium/phosphorus ratio in that structure (p > 0.05). Experimental T1DM caused important ultrastructural alterations in mature enamel as revealed by SEM and induced a statistically significant reduction of about 13.67 % in its microhardness at 80 µm from dentin-enamel juntion (p < 0.01). The present study indicates that T1DM may affect enamel development, leading to alterations of ultrastrutural and mechanical properties of mature enamel that may increase susceptibility to dental caries.

**Keywords:** Type 1 diabetes mellitus; Amelogenesis; Enamel organic extracellular matrix; Enamel; Light microscopy; Energy-dispersive x-ray analysis; Scanning electron microscopy; Microhardness testing.

# SUMÁRIO

| 1 INTRODUÇÃO   | 11 |
|--|----|
| 2 REVISÃO DE LITERATURA  | 13 |
| 3 JUSTIFICATIVA  | 18 |
| 4 OBJETIVOS  | 19 |
| 4.1 Objetivo Geral   | 19 |
| 4.2 Objetivos Específicos  | 19 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS   | 20 |
| 5.1 Animais, tratamentos e preparação do tecidos   | 20 |
| 5.2 MLTP da matriz orgânica do esmalte no estágio de secreção da amelogênese   | 21 |
| 5.3 EEDRX e MEV da superfície externa do esmalte maduro  | 22 |
| 5.4 TMD e MEV do esmalte maduro seccionado transversalmente  | 22 |
| 6 REFERÊNCIAS  | 24 |
| 7 CAPÍTULO 1. Effects of experimental type 1 diabetes mellitus on dental enamel formation assessed by light microscopy, energy-dispersive x-ray analysis, scanning | 27 |
| electron microscopy and microhardness testing  |    |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS   | 53 |
| ANEXO  | 54 |

### 1 INTRODUÇÃO

O esmalte dentário é o revestimento biocerâmico mais duro encontrado no corpo humano. Sua estrutura altamente organizada, contém os maiores cristais de hidroxiapatita biologicamente produzidos, organizados em estrutura prismática que lhe confere uma resistência única ao desgaste e à fratura, o que permite que os dentes sobrevivam durante toda a vida do organismo num ambiente úmido e com uma quantidade elevada de bactérias (PAINE *et al.*, 2000).

Os componentes da matriz orgânica do esmalte secretório (MOES) são biofabricados por células de origem epiteial denominadas ameloblastos, na fase de campânula, e incluem a principal proteína do esmalte, conhecida como amelogenina (RAVINDRANATH *et al.*, 2004), embora existam vários outros componentes proteicos presentes na MOES, em menor quantidade, que também podem influenciar nas suas propriedades biológicas. Esta matriz orgânica é clivada proteoliticamente e substituída por íons minerais que se depositam para formar cristais de hidroxiapatita (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2006). A mineralização do esmalte começa quase imediatamente após a secreção da matriz (DU *et al.*, 2006).

Dentre as alterações na formação do desenvolvimento do dente humano, a hipoplasia é a mais comum, esta é a principal expressão da amelogênese imperfeita seguida por hipocalcificação ou hipomineralização (KANCHA *et al.*, 2015). A hipoplasia do esmalte pode ser causada por fatores hereditários e fatores ambientais, um exemplo de fatores ambientais é a hiperglicemia durante o período gestacional que também pode afetar o desenvolvimento do esmalte dentário (SILVA-SOUSA *et al.*, 2003a).

A exemplo dos fatores hereditários associados a hipoplasia tem-se o diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), doença crônica, auto-imune caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina (CABRERA *et al.*, 2015; IBUKI *et al.*, 2013). As implicações do DMT1 abrangem danos a longo prazo, bem como disfunção e falha em diversos órgãos como olhos, rins, nervos, coração, vasos sanguíneos e ossos (GOMES-FILHO *et al.*, 2015). As manifestações clínicas do diabetes estão intimamente relacionadas com a gravidade da doença. No início os sintomas da hiperglicemia são poliúria, polidipsia, perda de peso, por vezes com polifagia, visão turva e cetoacidose (ATKINSON *et al.*, 2014).

Segundo YEH *et al.*, (2012) e ISMAIL *et al.*, (2015) pacientes com DMT1 tem uma maior incidência de problemas orais como gengivite, periodontite, candidíase oral e xerostomia. Vários estudos apontam que a susceptibilidade do esmalte à cárie e a incidência de hipoplasia do esmalte estão aumentadas nos pacientes com DMT1 (ABBASSY *et al.*, 2015; CARNEIRO

*et al.*, 2015), porém não esclarecem o mecanismo pelo qual a doença pode interferir na formação desta estrutura.

A organização supramolecular da MOES pode ser avaliada por meio de microscopia de luz polarizada, uma vez que a referida estrutura se apresenta fortemente birrefringente em cortes não corados de 5µm de espessura (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2006). A birrefringência reflete alto grau de organização em nível molecular com possível relevância funcional. Portanto, é plausível inferir que alterações na birrefringência da MOES decorrentes de distúrbios na homeostase, como aqueles observados na DMT1, possam refletir certo grau de desordem molecular, que por sua vez represente um ponto de partida para falhas na porção mineral do esmalte em formação.

### 2 REVISÃO DE LITERATURA

A dentição humana desenvolve-se através da uma interação de dois tecidos embrionários distintos o ectoderma e o mesoderma. No desenvolvimento embrionário, as células da crista neural invadem o tecido conjuntivo subjacente e migram para as proeminências maxilares e mandibulares. Estas células migratórias partilham características dos tecidos epiteliais e conjuntivos e são comumente referidas como ectomesenquima. Após inúmeros processos complexos, os dentes decíduos desenvolvem na sétima semana de gestação, enquanto a dentição permanente apenas na vigésima semana (AVERY, 2005).

Os dentes passam por estágios sucessivos de desenvolvimento. A amelogênese ou formação do esmalte dentário, se dá na fase de campânula, e ocorre em quatro etapas diferentes definidas pela morfologia e função dos ameloblastos, classificadas como: pré-secretora, de secreção, de transição e de maturação (Figura 1) (BARTLETT, 2013; SIMMER & HU, 2001). Os ameloblastos apresentam origem epitelial e formam uma camada única sobre o esmalte em desenvolvimento. Durante a amelogênese, o ameloblasto sintetiza e secreta os componentes da matriz orgânica do esmalte secretório (MOES). A MOES é uma matriz proteica, ausente de colágeno, acelular e não tem capacidade de remodelação.



Figura 1 – Alterações nos ameloblastos durante a amelogênese. (1) células do epitélio do órgão do esmalte; (2) início da diferenciação em pré-ameloblastos; (3) pré-ameloblastos e membrana basal em degeneração; (4) ameloblastos da fase de secreção com processo de Tomes desenvolvido; (5) ameloblastos perdem seu processo de Tomes e depositam a última camada de proteínas do esmalte; (6) ameloblastos na fase de transição; (7) ameloblastos na fase de maturação com membrana basal que varia de lisa a ondulada.

A fase de secreção é caracterizada pelo alongamento dos ameloblastos, formação de prolongamentos citoplasmáticos denominados de processos de Tomes, e pela deposição de uma

complexa mistura de proteínas que formam a matriz orgânica do esmalte secretório (PAINE & SNEAD, 1997).

A MOES adequadamente fixada e desmineralizada apresenta forte birrefringência, que é uma propriedade anisotrópica que reflete alto grau de organização em nível molecular, com possível relevância funcional. Uma estrutura birrefringente possui refração dupla, o que significa que a luz polarizada ao atravessá-la refrata como duas frentes de onda de luz. O desvio relativo entre essas frentes de onda é conhecido como retardo ótico do brilho de birrefringência que é medido em nanômetros (VIDAL, 2003). Quanto mais alto o valor do retardo ótico, mais ordenada é a estrutura biológica birrefringente em análise por meio de microscopia de luz polarizada (VIDAL, 2003).

No esmalte maduro a MOES é o menor componente, menos de 1%, mostrando que sua principal função, é de direcionar o crescimento dos cristais. Não existe espaço de tempo entre a secreção da matriz do esmalte e a sua mineralização. No momento que prossegue o desenvolvimento, a matriz orgânica é progressivamente removida, permitindo que os cristais de hidroxiapatita cresçam em espessura. Durante a fase de secreção, os ameloblastos se afastam da junção amelodentinária enquanto a espessura do esmalte aumenta (BARTLETT, 2013).

Esses eventos transformam uma matriz que contém aproximadamente 30% de mineral, em peso, sendo o restante material orgânico e água em uma estrutura altamente organizada que é quase completamente inorgânica. O principal constituinte da matriz orgânica do esmalte com 90% da sua constituição, é a amelogenina, uma proteína de natureza hidrofóbica, rica em prolina, glutamina, histidina e leucina, com capacidade de formar pequenos glóbulos conhecidos como nanosferas, que se alinham helicoidalmente orientando o crescimento dos futuros cristais de hidroxiapatita (DU *et al.*, 2006). Os outros 10% são formados por proteínas como enamelina, ameloblastina, e tufelina. Conhecidas como não amelogeninas, estas proteínas são poucas elucidadas devido a sua meia-vida curta (SIMMER & HU, 2001).

Ao atingir a espessura da camada do esmalte determinada geneticamente, os ameloblastos reduzem sua produção de proteínas e mudam de conformação, se tornando menos alongados e perdendo seu processo de Tomes, caracterizando a fase de transição (SIMMER & HU, 2001).

O esmalte dentário é o material mais duro encontrado em vertebrados muito semelhante ao do mineral hidroxiapatita encontrado na estrutura óssea. A junção amelodentinária (JAD) fornece suporte mecânico essencial que previne a deformação do esmalte, nas altas forças externas envolvidas na mastigação (OLDAK, 2013). Vários fatores podem afetar o desenvolvimento da dentição humana como alterações genéticas, distúrbios do fosfato de cálcio, hipo ou hipervitaminose, distúrbios metabólicos, alergias, febre, doenças imunológicas, endocrinopatias (incluindo diabetes mellitus), pressão arterial anormal, pós-irradiação, lesões e distúrbios associados à maternidade (CHAŁAS *et al.*, 2016). A hipoplasia, e a hipomineralização são as principais expressões de que ocorreu alguma alteração no processo de amelogênese. A hipoplasia do esmalte ocorre se a formação da matriz orgânica é afetada e pode se manifestar como erosão, ranhuras ou mesmo total ausência de esmalte, enquanto a hipomineralização resulta quando a maturação é defeituosa e se manifesta na forma de áreas opacas ou calcárias em superfícies de esmalte normalmente contornadas (KANCHAN *et al.*, 2015). Defeitos na formação do esmalte estão entre as alterações mais comuns da dentição humana e comprovadamente aumentam a predisposição à cárie, que ainda representa um problema de saúde pública no Brasil e em diversos outros países em desenvolvimento (ELLWOOD & O'MULLANE, 1996; MODESTO *et al.*, 2012).

Segundo ISMAIL *et al.*, (2015) indivíduos com diabetes geralmente, apresentam uma má saúde bucal com aumento da acumulação de detritos no biofilme dental, cálculo e estão em alto risco de se desenvolver cárie dentária. O diabetes mellitus é uma doença crônica metabólica em que o corpo não produz insulina, o que gera um aumento no nível de glicose no sangue levando a hiperglicemia.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2016), existem hoje cerca de 422 milhões de diabéticos em todo o mundo, o número de diabéticos dobrou nos últimos anos e deverá duplicar novamente no ano 2025. Nos Estados Unidos 29,1 milhões de pessoas sofrem de diabetes (KEVIN, 2016). No Brasil, existem mais de 13 milhões de pessoas que convivem com diabetes, o que representa 6,9% da população (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

O diabetes mellitus pode ser classificados como tipo 1, caracterizada pela incapacidade de produzir insulina, tipo 2 causada por uma utilização ineficaz da insulina no corpo e está frequentemente associada com o excesso de peso e à falta de atividade física, diabetes gestacional é a hiperglicemia que é reconhecida pela primeira vez durante a gravidez, e diabetes auto-imune latente do adulto é caracterizada em diabéticos adultos não necessitando de insulina inicialmente, mas que tinham auto-anticorpos contra células beta (WHO, 2016; CALSOLARI *et al.*, 2008).

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), anteriormente conhecido como diabetes insulinodependente, é uma doença auto-imune, em que as células beta que produzem insulina no pâncreas são destruídas, resultando em uma dependência da insulina exógena ao longo da vida (CABRERA & HENSCHEL, 2015). O diabetes tipo 1 tem sido considerado um distúrbio em crianças e adolescentes, mas esta característica mudou ao longo dos anos, de modo que a idade início sintomático não é um fator limitante.

Diabetes mellitus, a doença sistêmica mais comum do milênio tem amplo espectro de manifestações (YAMUNADEVI *et al.*, 2014). As manifestações clínicas do diabetes estão intimamente relacionadas com a gravidade da doença. No início os sintomas de hiperglicemia são poliúria, polidipsia, perda de peso, por vezes com polifagia, visão turva e cetoacidose (ATKINSON *et al.*, 2014). Poliúria é devido à alta concentração de glicose, os rins começam a excretar mais água para diluir a glicose. A polidipsia ocorre devido à perda excessiva de fluido através da urina. A polifagia devida ao estado catabólico induzido pela deficiência de insulina e clivagem de proteínas e lipídios. O não controle da hiperglicemia provoca anomalias no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular, conduzindo a complicações a longo prazo referidas como microvasculares ou macrovasculares.

Alterações em pequenos vasos, também tem sido reconhecida como complicação proveniente da permeabilidade vascular, em doenças periondontais (ORBAK, 2008; PHILLIPS, 2008; YAMUNADEVI, *et al.*, 2014). Complicações orais são comuns no diabetes e estes incluem xerostomia, gengivite e lesões nos tecidos moles. Hiperglicemia afeta a função imunológica e a resposta inflamatória, definindo o cenário ideal para cárie, doença periodontal e outras doenças. A doença periodontal é uma complicação importante do diabetes mellitus, e o tratamento desta condição resulta em um melhor controle metabólico (RAFATJOU, *et al.*, 2016). Reitera-se que todas as células do corpo estão expostas a níveis elevados de glicose no DM1, mas nem todas as células do corpo sofrem alterações associadas à lesão vascular (BROWNLEE, 2001).

A saliva humana desempenha numerosas funções, incluindo a de ser um protetor oral, a diminuição do fluxo salivar devido à desidratação causada por hiperglicemia, resultando em boca seca, sintoma frequente em pacientes diabéticos, o que aumenta a predisposição para doenças periondotais (PHILIPS, 2008). O aumento do tamanho das glândulas salivares no diabetes pode ser explicado pela diminuição do metabolismo da glicose que controla as atividades celulares, uma vez que a concentração de glicose e a osmolaridade celular tem uma relação estreita, levando a célula a um desequilíbrio eletrolítico (LILLIU *et al.*, 2015).

Alguns estudos demonstraram como o diabetes pode influenciar a formação de tecidos mineralizados da boca e sua ultraestrutura. As funções metabólicas dos ameloblastos e odontoblastos podem ser dificultadas pelo alto nível de glicose no sangue associado à condição de DM1 (ABBASSY *et al.*, 2015). No estudo de SILVA-SOUZA *et al.*, (2003) foram observado

alterações na ultraestrutura de ameloblastos de ratos com diabetes induzida experimentalmente, as alterações no esmalte encontradas nos ratos diabéticos foram: alteração da espessura da matriz do esmalte, altura dos ameloblastos, núcleo dos ameloblastos menor em animais diabéticos e alterações no retículo estrelado do órgão do esmalte. Hiperglicemia com função salivar comprometida leva a uma hipomineralização que é observada com o aparecimento de um fenótipo branco de giz em incisivos, que é sinal de mudança no esmalte (YEH 2012). A detecção precoce de hiperglicemia em pacientes diabéticos e xerostomia é essencial para preservar a integridade do esmalte.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Considerando que defeitos na formação do esmalte estão entre as alterações mais comuns da dentição humana e que comprovadamente aumentam a predisposição à cárie (KANCHAN *et al.*, 2015), é de grande relevância esclarecer mecanismos de formação de defeitos na estrutura do esmalte e possibilitar a prevenção dos referidos defeitos. Essa prevenção poderá reduzir a suscetibilidade à cárie, problema de saúde pública no Brasil e em outros países em desenvolvimento (ELLWOOD & O'MULLANE, 1996; MODESTO *et al.*, 2012). Existe associação entre defeitos de mineralização do esmalte e diabetes mellitus tipo 1 e falta de esclarecimento sobre o mecanismo de desenvolvimento das referidas alterações. Dessa forma, o presente estudo pode corroborar com evidências prévias de defeitos no esmalte dentário associados ao diabetes mellitus tipo 1 e contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de desenvolvimento das referidas alterações durante a amelogênese.

### **4 OBJETIVOS**

### 4.1 Objetivo Geral

Investigar em modelo animal os efeitos do diabetes mellitus tipo 1 sobre a formação do esmalte dentário.

### 4.2 Objetivos Específicos

Avaliar, em os incisivos superiores de ratos machos Wistar submetidos ao diabetes mellitus tipo 1 experimental:

• Birrefringência e morfologia da matriz orgânica do esmalte na fase de secreção da amelogênese, por meio de microscopias de luz de campo claro e polarizada;

• Propriedades mecânicas e estruturais do esmalte maduro, por meio de espectrometria de energia dispersiva de raios x, microscopia eletrônica de varredura e teste de microdureza.

# **5 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 5.1 Animais, tratamentos e preparação do tecidos

Aprovação ética para o presente estudo foi concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (Protocolo 007/2010), Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas com iluminação natural e temperatura média de  $24 \pm 0.5^{\circ}$ C, e foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

Vinte e três ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) pesando  $\approx 200$  g foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. Animais dos grupos Controle (n = 8) e Diabetes (n = 15) foram eutanasiados 56 dias após o início do experimento. O grupo Diabetes foi submetido a uma única injeção peritoneal de estreptozotocina (60 mg/kg; *Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA*) em solução tampão citrato 0,1 M, pH 4,5; e o grupo Controle recebeu injeções com volumes equivalentes apenas de solução tampão citrato 0,1 M, pH 4,5. Setenta e duas horas após as referidas injeções e posteriormente a cada duas semanas, os animais de ambos os grupos foram submetidos à mensuração de glicemia (glicosímetro Accu-Chek®, *Roche, Mannheim, Germany*) e todos aqueles que exibiram dosagens de glicemia superiores a 320 mg/dL foram considerados diabéticos. Utilizando-se este critério de exclusão, o grupo Diabetes passou então a apresentar n = 8. Os animais de ambos os grupos foram pesados um dia antes das injeções e posteriormente a cada duas semanas. Dosagens de glicemia e pesos corpóreos foram submetidos à análise estatística (teste t ou Mann-Whitney, dependendo da variabilidade dos dados) de modo a comparar os grupos Controle e Diabetes.

Cinquenta e seis dias após as injeções, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com xilazina/cetamina (1/1; 0,2 mL/100g) e perfundidos com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 0,2% em solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2. As hemimaxilas foram então removidas de imersas por 24 h na mesma solução fixadora utilizada para perfusão. O incisivo superior de cada hemimaxila foi seccionado transversalmente 2 mm acima da crista óssea alveolar, utilizando-se um micrótomo para tecido duro (*South Bay Technology Inc., Model 650, USA*). A Fig. 1 adequadamente demonstra a linha de tempo experimental do presente trabalho.

Hemimaxilas contendo o fragmento posterior do incisivo superior foram submetidas a desmineralização por imersão em solução aquosa de ácido nítrico 5%, formaldeído 4% sob agitação orbital contínua por 24 h. Após desidratação e diafanização, as amostras desmineralizadas foram infiltradas e incluídas em parafina, e cortes longitudinais seriados de 5 µm de espessura foram obtidos por meio de um micrótomo *Leica RM2155* (Leica

Microsystems, Germany). Dez cortes longitudinais de cada hemimaxila mostrando matriz orgânica do esmalte secretório vestibular foram selecionados, utilizando-se como parâmetro o paralelismo dos cortes no sentido do longo eixo das amostras. Dessa forma, cortes que exibiam esmalte secretório lateral foram descartados e matrizes orgânicas do esmalte secretório de todos os cortes selecionados apresentaram alturas semelhantes e arranjos equivalentes de proteínas da matriz, podendo ser comparados quanto a birrefringência exibida. Os cortes foram tratados com xilol para remoção da parafina e hidratados. Eles foram analisados com microscopia de luz transmitida polarizada (MLTP).

Os fragmentos mineralizados anteriores dos incisivos superiores direitos foram utilizados para estudo da composição química e da topografia da superfície externa do esmalte maduro vestibular por espectrometria de energia dispersiva de raios x (EEDRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. Os fragmentos mineralizados anteriores dos incisivos superiores esquerdos foram utilizados para teste de microdureza (TMD) e MEV do esmalte maduro em corte transversal (de modo a acessar morfologia de regiões internas daquela estrutura).

### 5.2 MLTP da matriz orgânica do esmalte no estágio de secreção da amelogênese

Cortes longitudinais não corados das hemimaxilas de cada animal foram analisados para determinar o retardo ótico (nm) do brilho de birrefringência na MOES de incisivos superiores. Vinte cortes de cada dente foram imersos em solução aquosa de glicerina 80% como meio de embebição por 30 min e 5 medidas foram realizadas por observador cego em relação aos grupos de estudo. Um valor médio de retardos óticos foi obtido para cada animal. Um microscópio *Leica DM LP (Leica Microsystems)* equipado com filtros polarizadores, compensador de Brace-Köhler (*Wild Leitz, Wetzlar, Germany*) e luz policromática foi utilizado. As mensurações foram submetidas a análise estatística (teste de Mann-Whitney). Vinte e cinco por cento dos cortes analisados com MLTP foram também corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscopia de luz de campo claro (MLCC) com o objetivo de demonstrar satisfatória preservação estrutural.

Curvas de dispersão de birrefringência foram obtidas após determinação de retardos óticos da área que mostrou o maior brilho de birrefringência, em função do índice de refração (n) dos seguintes meios de embebição: água (n = 1,333), solução aquosa de glicerina 80% (n = 1,435), glicerina 100% (n = 1,461), bálsamo do Canadá sintético Dinâmica® (n = 1,53) e bálsamo do Canadá sintético Caedax® (n = 1,56). Os cortes foram imersos em cada um destes meios de embebição por 30 min antes da mensuração do retardo ótico. Os mencionados fluidos

foram utilizados na ordem em que aqui foram citados e cuidadosamente removidos dos cortes com um solvente adequado (água ou xilol).

### 5.3 EEDRX e MEV da superfície externa do esmalte maduro

Fragmentos mineralizados anteriores dos incisivos superiores direitos de ratos diabéticos e controles foram higienizados com ultra-som, desidratados e montados em stubs de acrílico. Inicialmente os referidos fragmentos foram cobertos com carbono e submetidos a análise com EEDRX com o objetivo de acessar a composição química da região plana da superfície externa do esmalte maduro vestibular próximo à linha do corte. Duas pequenas áreas planas da superfície do esmalte vestibular no mesmo plano focal e sem defeitos foram selecionadas para a referida análise. O polimento da superfície do esmalte vestibular poderia expor o esmalte superficial aprismático ou interno prismático, tornando difícil a análise com EEDRX devido à presença de áreas irregulares. Um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-5600 V (JEOL LTD., Tokyo, Japan) foi utilizado. Um padrão (amostra com concentração conhecida dos elementos químicos que foram investigados) foi usado antes da análise com EEDRX para garantir a validação das mensurações. Valores proporcionais dos elementos químicos investigados nas amostras dos ratos diabéticos e controles foram submetidos a análise estatística (teste de Mann-Whitney). Após EEDRX, os mesmos espécimes foram metalizados com ouro e submetidos a microscopia eletrônica de varredura para análise da topografia da superfície externa do esmalte vestibular usando microscópio eletrônico aqui mencionado. Os grupos foram comparados por análise descritiva.

### 5.4 TMD e MEV do esmalte maduro seccionado transversalmente

Para TMD, fragmentos anteriores dos incisivos superiores esquerdos de animais diabéticos e controles foram embutidos em blocos de resina acrílica e tiveram sua extremidade distal polida com papéis de carboneto de silício com granulações de 400, 600 e 1200 em máquina politriz (Arotec, Cotia, SP, Brasil), e então polimento final papel de polimento de diamante. Um microdurômetro (*Model FMA-ARS, Future Tech Corp., Tokyo, Japan*) foi utilizado para acesso à microdureza de regiões internas do esmalte maduro. Cinco endentações, separadas em 50 µm uma da outra, foram feitas a 40 e 80 µm da junção amelodentinária (JAD) no esmalte maduro vestibular, compreendendo um total de 10 endentações por dente. A carga usada foi de 20 g e o tempo de 5 s. TMD foi realizado por observador cego em relação aos grupos de estudo. Os grupos foram comparados submetendo os valores de microdureza Knoop a análise estatística (teste t). Após TMD, os espécimes foram polidos, tratados com ácido,

desidratados, metalizados com ouro e examinados com um microscópio eletrônico de varredura *Jeol JSM-5600 V (JEOL LTD., Tokyo, Japan)*. Morfologia de regiões internas do esmalte maduro (orientação e organização dos bastões) dos ratos diabéticos e controles foi comparada por análise descritiva.

## REFERÊNCIAS

ABBASSY M. A.; WATARI, I.; BAKRY, A. S.; HAMBA, H.; HASSAN, ALI H.; TAGAMI, J.; Ono, T. Diabetes detrimental effects on enamel and dentine formation. **Journal** of dentistry, vol. 43, pag. 589 – 596, 2015.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. Lancet, Vol. 383, pag. 69-82, 2014.

AVERY, James K. et al. **Desenvolvimento e histologia bucal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, Liv. Santos, 2005.

BARTLETT, J.D. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. **ISRN dentistry**, vol.16, n.1, pag. 4-24, 2013.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature** vol. 414, pag. 813–20, 2001.

CABRERA, S. M.; HENSCHEL, A. M.; HESSNER, M. J. Innate inflammation in type 1 diabetes. **Translational Research**, pag. 1-10, 2015.

CALSOLARI, M.G.; ROSÁRIO, P.W..S.; REIS, J.S.; SILVA, S.C.; PURISCH, S. Diabetes Auto-Imune Latente do Adulto ou Diabetes Melito Tipo 2 Magro? Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, vol. 2, pag. 52, 2008.

CARNEIRO, V.L.; FRAIZ, F.C.; FERREIRA, F. M.; PINTARELLI, T.P.; OLIVEIRA, A.C.B.; BOGUSZEWSKI, M.C.S. The influence of glycemic control on the oral health of children and adolescentes with diabetes mellitus type. **The Journal of Clinical Endocrinology** & Metabolism, vol. 59, pag. 535-40, 2015.

CHAŁAS, R.; RUDZKA, O.; WÓJCIK-CHĘCIŃSKA, I.; VODANOVIĆ, M. The impact of type 1 diabetes on the development of the craniofacial mineralized tissues (bones and teeth): literature review. **Folia Morphologica**, Vol. 75, No. 3, 2016.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2015-2016) / Adolfo Milech...[*et. al.*]; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

DU, C.; FALINI, G.; FERMANI, S.; ABBOTT, C.; MORADIAN-OLDAK, J. Supramolecular Assembly of Amelogenin Nanospheres into Birefringent Microribbons. **Science**. Vol. 307, pag. 1454, 2005.

DO ESPÍRITO SANTO, A.R.; NOVAES, P.D.; LINE, S.R.P. Anisotropic properties of the enamel organic extracellular matrix. **European Journal of Oral Sciences**, vol. 114, pag. 333-7, 2006.

ELLWOOD, R.P.; O'MULLANE, D. The association between developmental enamel defects and caries in populations with and without fluoride in their drinking water. **Journal of public health dentistry**, Raleigh, vol.56, n.2, pag.76-80, 1996.

GOMES-FILHO, J. E.; QUEIROZ, I. O. A.; WATANABE, S.; SANTOS, L. M. S.; LODI,C. S.; OKAMOTO, R.; ERVOLINO, E.; DEZAN JR, E.; CINTRA, L. T. A. Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate Mineralization. **Dental Traumatology**, vol. 31, pag. 67-72, June 2015.

IBUKI, F. K.; SIMÕES, A.; NICOLAU, J.; NOGUEIRA, F. N. Laser irradiation affects enzymatic antioxidant system of streptozotocin-induced diabetic rats. Lasers in Medical Science, vol. 28, pag. 911–918, 2013

ISMAIL, F.A.; COLMAN, P.M., CYNTHIA K.Y. Oral health of children with type 1 diabetes mellitus: A systematic review. **Diabetes research and clinical practice**, pag. 369-381, March 2015.

KANCHAN, T.; MACHADO, M.; RAO, M.; KRISHAN, K.; GARG, A. K. Enamel hypoplasia and its role in identification of individuals: A review of Literature. **Indian Journal of Dental Research**, vol. 6, pag. 99-102, 2015.

KEVIN, I. Insights into the percutaneous penetration of antidiabetic agents. **Journal of Drug Targeting**, 2016.

LILLIU, M. A.; SOLINAS, P.; COSSU, M.; PUXEDDU, R.; LOY, F.; ISOLA, R.; QUARTU, M.; MELIS, T.; ISOLA, M. Diabetes causes morphological changes in human submandibular gland: a morphometric study. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, vol. 44, pag. 291–295, 2015.

MODESTO, A.; KLEIN, O.; TENUTA, L.M.; GERLACH, R.F.; VIEIRA, A.R. Summary of the IADR Cariology Research, Craniofacial Biology, and Mineralized Tissue Groups Symposium, Iguaçu Falls, Brazil, June 2012: Gene-environment Interactions and Epigenetics in Oral Diseases: Enamel Formation and its Clinical Impact on Tooth Defects, Caries, and Erosion. **Dentistry 3000**. 2013. 1: http://dentistry3000.pitt.edu/ojs/index.php/dentistry3000, 2017.

OLDAK, J.M. Protein-mediated enamel mineralization. Frontiers Bioscience, pag, 1996–2023, 2013.

PAINE, M.L.; SNEAD, M.L. Protein interactions during assembly of the enamel organic extracellular matrix. **Journal of bone and mineral research**: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, Washington, v.12, n.2, p.221-7, 1997.

PAINE, M. L.; ZHU, D.; LUO, W.; BRINGAS, P.; GOLDBERG, M.; WHITE, S. N.; LEI, Y.; SARIKAYA, M.; FONG, H. K.; SNEAD, M. L. Enamel Biomineralization Defects Result from Alterations to Amelogenin Self-Assembly. Journal of Structural Biology, vol. 132, pag. 191-200, 2000.

PHILLIPS, P.J. Dental problems in diabetes Add a dentist to the diabetes team **Australian Family Physician**, Vol. 37, No. 7, July 2008.

RAVINDRANATH, H. H.; CHEN, L. S.; ZEICHNER-DAVID, M.; ISHIMA, R.; RAVINDRANATH, R. M. Interaction between the enamel matrix proteins amelogenin and

ameloblastin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 323, pag. 1075-83, 2004.

SILVA-SOUSA, Y.T. C.; PERES, L. C.; FOSS, M. C. Enamel Hypoplasia in a Litter of Rats with Alloxan-Induced Diabetes Mellitus. **Brazilian Dental Journal**, vol. 14, pag. 87-93, 2003a.

SILVA-SOUSA, Y. T. C.; PERES, L. C.; FOSS, M. C.; Are There Structural Alterations in the Enamel Organ of Offspring of Rats with Alloxan-Induced Diabetes Mellitus? **Brazilian Dental Journal**, v. 14(3), pag. 162-167, 2003b.

VIDAL, B. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron: the international research and review journal for microscopy**, Oxford, v.34, n.8, p.423-32, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Diabetes Mellitus – epidemiology. 2. Diabetes Mellitus – prevention and control. 3. Diabetes, Gestational. 4. Chronic Disease. 5. Public Health. I. 2016.

YAMUNADEVI, A.; BASANDI, P.S.; MADHUSHANKARI, G.S.; DONOGHUE, M.; MANJUNATH, A.; SELVAMANI, M.; PUNEETH, H.K. Morphological alterations in the dentition of type I diabetes mellitus patients. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, vol. 6, pag. 22-126, 2014.

YEH, C.; HARRIS, S. E.; MOHAN, S.; HORN, D.; FAJARDO, R.; CHUN, Y. P.; JORGENSEN, J.; MACDOUGALL, M.; ABBOUD-WERNER, S. Hyperglycemia and xerostomia are key determinants of tooth decay in type 1 diabetic mice. Laboratory Investigation - Nature, vol. 92, pag. 868-882, 2012.

# 7 CAPÍTULO 1

Efeitos do diabetes mellitus tipo 1 experimental sobre a formação do esmalte evidenciados por meio de microscopia de luz, espectrometria de energia dispersiva de raios x, microscopia eletrônica de varredura e teste de microdureza. Versão em inglês deste artigo foi submetida à publicação no periódico internacional *Journal of Oral Pathology & Medicine* (ISSN 0904-2512; *Qualis* 2015 B2 na área Ciências Biológicas I) em 27 de abril de 2016.

Efeitos do diabetes mellitus tipo 1 experimental sobre a formação do esmalte evidenciados por meio de microscopia de luz, espectrometria de energia dispersiva de raios x, microscopia eletrônica de varredura e teste de microdureza

Título conciso: Estrutura do esmalte em ratos diabéticos

# Bruna Larissa Lago Silva<sup>1</sup>, Danila Lima Medeiros<sup>2</sup>, Ana Prates Soares<sup>1</sup>, Sérgio Roberto Peres Line<sup>3</sup>, Maria das Graças Farias Pinto<sup>4</sup>, Telma de Jesus Soares<sup>1</sup>, Alexandre Ribeiro do Espírito Santo<sup>5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia UFBA, Rua Rio de Contas, 58, Quadra 17, Lote 58, Candeias, Vitória da Conquista/BA, Brasil, CEP 45.029-094.
- <sup>2</sup> Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia UFBA, Rua Araújo Pinho, 32, Canela, Salvador/BA, Brasil, CEP 40110-150.
- <sup>3</sup> Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas UNICAMP, Av. Limeira,
   901, Areião, Piracicaba/SP, Brasil, CEP 13.414-903.
- <sup>4</sup> Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia UFBA, Av. Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador/BA, Brasil, CEP 40.170-110.
- <sup>5</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela, Salvador/BA, Brasil, CEP 40.110-902.

\* Autor correspondente em: Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, Departamento de Biomorfologia, Av. Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela, Salvador/BA, Brasil, CEP 40.110-902.

Endereço de correio eletrônico: arespiritosanto@ufba.br (A. R. do Espírito Santo).

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar birrefringência e morfologia da matriz orgânica do esmalte na fase de secreção da amelogênese (MOES) e propriedades mecânicas e estruturais do esmalte maduro de incisivos superiores de ratos adultos mantidos vivos por um período de 56 dias após indução de diabetes mellitus tipo 1 experimental (DMT1) com injeção única de estreptozotocina (60 mg/Kg), utilizando-se microscopias de luz de campo claro e polarizada (MLCC e MLP), espectrometria de energia dispersiva de raios x (EEDRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teste de microdureza. MLCC e MLP mostraram discretas alterações estruturais e pequena redução nos valores de retardo ótico do brilho de birrefringência da MOES em ratos diabéticos comparados aos controles (p > 0,05). EEDRX demonstrou que DMT1 experimental induziu pequenos aumentos estatisticamente significativos das quantidades de cálcio e fósforo na superfície externa do esmalte maduro (p < 0,01) com preservação da razão cálcio/fósforo naquela estrutura (p > 0,05). DMT1 experimental causou importantes alterações ultraestruturais no esmalte maduro reveladas por meio de MEV, e induziu uma redução estatisticamente significante de aproximadamente 13,67 % em sua microdureza à 80 µm de distância da junção amelodentinária (p < 0,01). O presente estudo indica que a DMT1 pode afetar o desenvolvimento do esmalte, levando a alterações das propriedades ultraestruturais e mecânicas do esmalte maduro, que podem aumentar a susceptibilidade a cáries.

# Palavras-chave

Diabetes Mellitus Tipo 1; Amelogênese; Matriz Orgânica do Esmalte Dentário; Esmalte Dentário; Microscopia de Luz; Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X; Microscopia Eletrônica de Varredura; Teste de Microdureza.

# Introdução

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (2015) e Katsarou *et al.* (2017), quase 9% da população adulta mundial é diabética e dentre todos os indivíduos diabéticos apenas 10–15% apresentam diabetes mellitus tipo 1 (DMT1). Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é a forma mais comum, no entanto, DMT1 é a forma mais comum de diabetes em crianças (Katsarou *et al.*, 2017), ocorrendo portanto no mesmo período de desenvolvimento dos dentes decíduos e permanentes. Mais de quinhentas mil crianças no mundo estão vivendo atualmente com DMT1 (Katsarou *et al.*, 2017).

DMT1, também conhecida como diabetes autoimune (Katsarou *et al.*, 2017), é cracaterizada por hiperglicemia crônica causada por quantidade muito pequena ou ausente de insulina secretada por células β pancreáticas (*World Health Organization*, 1999; Chałas, Rudzka, Wójcik-Chęcińska, & Vodanović, 2016; Katsarou *et al.*, 2017). Apesar da etiologia da DMT1 não ser completamente compreendida, a patogênese da doença parece envolver a produção de autoanticorpos que alvejam proteínas associadas aos grânulos de secreção das células e destruição destas células mediada por linfócitos T (Katsarou *et al.*, 2017). Os efeitos patogênicos da hiperglicemia resultam do excesso de produção de superóxido por cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, resultando em estresse oxidativo (Giacco & Brownlee, 2010; Paneni, Beckman, Creager, & Cosentino, 2013; Katsarou *et al.*, 2017). Hiperglicemia e consequente estresse oxidativo são responsáveis por anomalias estruturais e funcionais dos tecidos, as quais provavelmente incluem injúria ao órgão do esmalte que leva a defeitos no esmalte maduro (Chałas, Rudzka, Wójcik-Chęcińska, & Vodanović, 2016; Atar, Atar-Zwillenberg, Verry, & Spornitz, 2004; Silva-Sousa, Peres, & Foss, 2003).

O conhecimento atual sobre os efeitos da DMT1 sobre o desenvolvimento dentário decorre de poucos estudos científicos (El-Bialy, Aboul-Azm & El-Sakhawy, 2000; Gutowska *et* 

al., 2011; Moore et al., 2001; Norén, 1984; Ozbek, Dural, Kanli, Tuncel, & Orhan, 2009; Silva-Sousa, Peres & Foss, 2003a; Weerheijm, 2004; Yamunadevi et al., 2014; Abbassy et al., 2015; Chałas, Rudzka, Wójcik-Chęcińska & Vodanović, 2016; Atar, Atar-Zwillenberg, Verry & Spornitz, 2004; Silva-Sousa, Peres & Foss, 2003b). O desenvolvimento dentário compreende eventos complexos altamente controlados, caracterizados por interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC) (Thesleff et al., 1995). Estas interações resultam na diferenciação de odontoblastos e ameloblastos, os quais produzem dentina e esmalte, respectivamente (Thesleff et al., 1995; Nelson-Filho et al., 2012). O esmalte é formado em microambiente extracelular por secreção, processamento e autoagregação de uma complexa mistura de proteínas que controla o crescimento e a morfologia dos maiores cristais de apatita carbonatada contendo fluoreto formados biologicamente. Após o completo crescimento destes cristais em altura, a mineralização do esmalte prossegue com o alargamento e fusão dos referidos cristais, dando origem à estrutura mais mineralizada do corpo vertebrado (Bartlett, 2013). No incisivo de rato, estes eventos ocorrem continuamente de modo restrito em tempo e espaço, uma vez que em qualquer idade do animal zonas distintas de esmalte secretório, em maturação e maduro são observadas a depender do estágio de desenvolvimento do referido dente (Smith & Nanci, 1989). O esmalte envolve a coroa dos dentes (Bartlett, 2013) e existem evidências de que alterações no desenvolvimento desta estrutura estão relacionadas a maior suscetibilidade à cárie (Ellwood, & O'Mullane, 1996; Modesto et al., 2013). Portanto, é importante investigar os efeitos de fatores genéticos e ambientais, bem como de doenças sistêmicas como a DMT1 sobre a formação do esmalte dentário.

Para testar a hipótese de que DMT1 pode perturbar a formação do esmalte, no presente estudo, investigaram-se birrefringência e morfologia da matriz orgânica do esmalte no estágio de secreção da amelogênese (MOES), e propriedades mecânicas e estruturais do esmalte maduro de incisivos superiores de ratos adultos submetidos DMT1 experimental induzida por injeção única de estreptozotocina, com a utilização de microscopias de luz polarizada e de campo claro, espectrometria de energia dispersiva de raios x, microscopia eletrônica de varredura e teste de microdureza.

# Material e Métodos

#### Animais, tratamentos e preparação dos tecidos

Aprovação ética para o presente estudo foi concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (Protocolo 007/2010), Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas com iluminação natural e temperatura média de 24  $\pm$  0,5°C, e foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

Vinte e três ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) pesando  $\approx$  200 g foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. Animais dos grupos Controle (n = 8) e Diabetes (n = 15) foram eutanasiados 56 dias após o início do experimento. O grupo Diabetes foi submetido a uma única injeção peritoneal de estreptozotocina (60 mg/kg; *Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA*) em solução tampão citrato 0,1 M, pH 4,5; e o grupo Controle recebeu injeções com volumes equivalentes apenas de solução tampão citrato 0,1 M, pH 4,5. Setenta e duas horas após as referidas injeções e posteriormente a cada duas semanas, os animais de ambos os grupos foram submetidos à mensuração de glicemia (glicosímetro Accu-Chek<sup>®</sup>, *Roche, Mannheim, Germany*) e todos aqueles que exibiram dosagens de glicemia superiores a 320 mg/dL foram considerados diabéticos. Utilizando-se este critério de exclusão, o grupo Diabetes passou então a apresentar n = 8. Os animais de ambos os grupos foram pesados um

dia antes das injeções e posteriormente a cada duas semanas. Dosagens de glicemia e pesos corpóreos foram submetidos à análise estatística (teste t ou Mann-Whitney, dependendo da variabilidade dos dados) de modo a comparar os grupos Controle e Diabetes.

Cinquenta e seis dias após as injeções, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com xilazina/cetamina (1/1; 0,2 mL/100g) e perfundidos com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 0,2% em solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2. As hemimaxilas foram então removidas de imersas por 24 h na mesma solução fixadora utilizada para perfusão. O incisivo superior de cada hemimaxila foi seccionado transversalmente 2 mm acima da crista óssea alveolar, utilizando-se um micrótomo para tecido duro (*South Bay Technology Inc., Model 650, USA*). A Fig. 1 adequadamente demonstra a linha de tempo experimental do presente trabalho.



**Fig. 1.** Linha de tempo experimental. Todos os animais foram pesados um dia antes das injeções. (dia -1). Ratos dos grupos Diabetes e Controle receberam, respectivamente, injeções de estreptozotocina/tampão citrato e apenas tampão citrato no dia 0. Os animais de ambos os grupos foram submetidos a mensuração de glicemia no dia 3 e todos aqueles que exibiram glicemia acima de 320 mg/dL foram considerados diabéticos. Após o dia 3, todos os ratos foram submetidos a pesagem e mensuração de glicemia a cada duas semanas. Cinquenta e seis dias após as injeções (no dia 57), os animais de ambos os grupos foram adequadamente anestesiados e perfundidos com solução fixadora para remoção cirúrgica e coleta das hemimaxilas.

Hemimaxilas contendo o fragmento posterior do incisivo superior foram submetidas a desmineralização por imersão em solução aquosa de ácido nítrico 5%, formaldeído 4% sob agitação orbital contínua por 24 h. Após desidratação e diafanização, as amostras desmineralizadas foram infiltradas e incluídas em parafina, e cortes longitudinais seriados de 5 µm de espessura foram obtidos por meio de um micrótomo *Leica RM2155* (Leica Microsystems, Germany). Dez cortes longitudinais de cada hemimaxila mostrando matriz orgânica do esmalte secretório vestibular foram selecionados, utilizando-se como parâmetro o paralelismo dos cortes no sentido do longo eixo das amostras. Dessa forma, cortes que exibiam esmalte secretório lateral foram descartados e matrizes orgânicas do esmalte secretório de todos os cortes selecionados apresentaram alturas semelhantes e arranjos equivalentes de proteínas da matriz, podendo ser comparados quanto a birrefringência exibida. Os cortes foram tratados com xilol para remoção da parafina e hidratados. Eles foram analisados com microscopia de luz transmitida polarizada (MLTP).

Os fragmentos mineralizados anteriores dos incisivos superiores direitos foram utilizados para estudo da composição química e da topografia da superfície externa do esmalte maduro vestibular por espectrometria de energia dispersiva de raios x (EEDRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. Os fragmentos mineralizados anteriores dos incisivos superiores esquerdos foram utilizados para teste de microdureza (TMD) e MEV do esmalte maduro em corte transversal (de modo a acessar morfologia de regiões internas daquela estrutura).

### MLTP da matriz orgânica do esmalte no estágio de secreção da amelogênese

Cortes longitudinais não corados das hemimaxilas de cada animal foram analisados para determinar o retardo ótico (nm) do brilho de birrefringência na MOES de incisivos superiores. Vinte cortes de cada dente foram imersos em solução aquosa de glicerina 80% como meio de embebição por 30 min e 5 medidas foram realizadas por observador cego em relação aos grupos de estudo. Um valor médio de retardos óticos foi obtido para cada animal. Um microscópio *Leica DM LP (Leica Microsystems)* equipado com filtros polarizadores, compensador de Brace-Köhler (*Wild Leitz, Wetzlar, Germany*) e luz policromática foi utilizado. As mensurações foram submetidas a análise estatística (teste de Mann-Whitney). Vinte e cinco por cento dos cortes analisados com MLTP foram também corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscopia de luz de campo claro (MLCC) com o objetivo de demonstrar satisfatória preservação estrutural.

Curvas de dispersão de birrefringência foram obtidas após determinação de retardos óticos da área que mostrou o maior brilho de birrefringência, em função do índice de refração (n) dos seguintes meios de embebição: água (n = 1,333), solução aquosa de glicerina 80% (n = 1,435), glicerina 100% (n = 1,461), bálsamo do Canadá sintético Dinâmica<sup>®</sup> (n = 1,53) e bálsamo do Canadá sintético Caedax<sup>®</sup> (n = 1,56). Os cortes foram imersos em cada um destes meios de embebição por 30 min antes da mensuração do retardo ótico. Os mencionados fluidos foram utilizados na ordem em que aqui foram citados e cuidadosamente removidos dos cortes com um solvente adequado (água ou xilol).

### EEDRX e MEV da superfície externa do esmalte maduro

Fragmentos mineralizados anteriores dos incisivos superiores direitos de ratos diabéticos e controles foram higienizados com ultra-som, desidratados e montados em *stubs* de acrílico. Inicialmente os referidos fragmentos foram cobertos com carbono e submetidos a análise com EEDRX com o objetivo de acessar a composição química da região plana da

superfície externa do esmalte maduro vestibular próximo à linha do corte. Duas pequenas áreas planas da superfície do esmalte vestibular no mesmo plano focal e sem defeitos foram selecionadas para a referida análise. O polimento da superfície do esmalte vestibular poderia expor o esmalte superficial aprismático ou interno prismático, tornando difícil a análise com EEDRX devido à presença de áreas irregulares. Um microscópio eletrônico de varredura Jeol *JSM-5600 V (JEOL LTD., Tokyo, Japan)* foi utilizado. Um padrão (amostra com concentração conhecida dos elementos químicos que foram investigados) foi usado antes da análise com EEDRX para garantir a validação das mensurações. Valores proporcionais dos elementos químicos investigados nas amostras dos ratos diabéticos e controles foram submetidos a análise estatística (teste de Mann-Whitney). Após EEDRX, os mesmos espécimes foram metalizados com ouro e submetidos a microscopia eletrônica de varredura para análise da topografia da superfície externa do esmalte vestibular usando microscópio eletrônico aqui mencionado. Os grupos foram comparados por análise descritiva.

### TMD e MEV do esmalte maduro seccionado transversalmente

Para TMD, fragmentos anteriores dos incisivos superiores esquerdos de animais diabéticos e controles foram embutidos em blocos de resina acrílica e tiveram sua extremidade distal polida com papéis de carboneto de silício com granulações de 400, 600 e 1200 em máquina politriz (Arotec, Cotia, SP, Brasil), e então polimento final papel de polimento de diamante. Um microdurômetro (*Model FMA-ARS, Future Tech Corp., Tokyo, Japan*) foi utilizado para acesso à microdureza de regiões internas do esmalte maduro. Cinco endentações, separadas em 50 µm uma da outra, foram feitas a 40 e 80 µm da junção amelodentinária (JAD) no esmalte maduro vestibular, compreendendo um total de 10 endentações por dente. A carga usada foi de 20 g e o tempo de 5 s. TMD foi realizado por

observador cego em relação aos grupos de estudo. Os grupos foram comparados submetendo os valores de microdureza Knoop a análise estatística (teste t). Após TMD, os espécimes foram polidos, tratados com ácido, desidratados, metalizados com ouro e examinados com um microscópio eletrônico de varredura *Jeol JSM-5600 V (JEOL LTD., Tokyo, Japan*). Morfologia de regiões internas do esmalte maduro (orientação e organização dos bastões) dos ratos diabéticos e controles foi comparada por análise descritiva.

# Resultados

Os grupos Diabetes e Controle mostraram glicemia média de 568,85 mg/dL  $\pm$  12,78 mg/dL e 113,4 mg/dL  $\pm$  7,12 mg/dL, respectivamente, do dia 3 ao final do experimento. Estes resultados exibiram diferença estatisticamente significante entre os grupos de estudo (p = < 0,0001; teste t). Animais do grupo Diabetes mostrou expressiva e estatisticamente significante redução nos pesos corpóreos nos dias 14 (p = 0,0074, teste de Mann-Whitney), 28 (p = < 0,0001, teste t), 42 e 54 (p = 0,0008, teste de Mann-Whitney) da linha de tempo experimental (Tabela 1).

|          |   | Dia do experimento |      |                    |                       |        |                    |      |                       |        |             |                       |        |        |
|----------|---|--------------------|------|--------------------|-----------------------|--------|--------------------|------|-----------------------|--------|-------------|-----------------------|--------|--------|
| Grupos   | n | -1                 |      |                    | 14                    |        | 28                 | 8    |                       | 42     |             |                       | 54     |        |
|          |   | Peso               |      |                    | Peso                  |        | Peso               |      | Peso                  |        |             | Peso                  |        |        |
|          |   | Média              | DP   | Mediana            | q1                    | q3     | Média              | DP   | Mediana               | q1     | q3          | Mediana               | q1     | q3     |
| Controle | 8 | 183,8ª             | 37,2 | 257,5 <sup>a</sup> | 240                   | 267,5  | 281,6°             | 41.0 | 302,5 <sup>e</sup>    | 276,25 | 326,25      | 315,0 <sup>g</sup>    | 290,0  | 352,5  |
| Diabetes | 8 | 181,3ª             | 25,9 | 180,0 <sup>b</sup> | 167,5                 | 186,25 | 162,5 <sup>d</sup> | 19.0 | 187,5 <sup>f</sup>    | 173,75 | 196,25      | 177,5 <sup>h</sup>    | 166,25 | 183,75 |
|          |   | p = 0,8824;        |      | p =                | p = 0,0074;           |        | p = < 0,0001;      |      | p = 0,0008;           |        | p = 0,0008; |                       |        |        |
|          |   | teste t            |      | teste de           | teste de Mann-Whitney |        | teste t            |      | teste de Mann-Whitney |        |             | teste de Mann-Whitney |        |        |

TABELA 1. Pesos corpóreos dos animais dos grupos Diabetes e Controle ao longo da linha de tempoexperimental. Uma diminuição estatisticamente significante foi observada a partir do dia 14.

DP = desvio padrão; q = quartil.

Letras diferentes expressam diferença estatística.

A MOES apresentou birrefringência mensurável nos dois grupos (Fig. 2; Fig. 3A, C). Ratos do grupo Diabetes mostraram discreta diminuição no retardo ótico do brilho de birrefringência ao ser utilizada solução aquosa de glicerina 80% como meio de embebição. A referida redução não foi estatisticamente significativa aos compararmos aqueles animais com os ratos do grupo Controle (p > 0,05; teste de Mann-Whitney; Fig. 2; Fig. 3A, C). MLCC mostrou que o diabetes experimental não tinha induzido expressivas alterações morfológicas na MOES (Fig. 3B, D). No entanto, apesar de áreas equivalentes da MOES terem sido analisadas nos dois grupos, a camada de MOES dos ratos diabéticos pareceu mais delgada que aquela observada nos ratos controles (Fig. 3A, B, C, D).



**Fig. 2.** Retardos óticos (nm) do brilho de birrefringência de cortes não corados 5 μm de espessura da MOES dos grupos Diabetes e Controle. Note que o diabetes experimental induziu uma discreta diminuição nos retardos óticos. Contudo, a referida diminuição não se mostrou estatisticamente significante (p > 0,05).

Ratos diabéticos e controles exibiram curvas de dispersão de birrefringência semelhantes (Fig. 4). Os maiores retardos (birrefringência de forma) para as séries de índices de refração corresponderam a n = 1,435 (solução aquosa de glicerina 80%) em ratos controles e diabéticos, e os menores retardos (birrefringência intrínseca) para as séries de índices de

refração corresponderam a n = 1,56 (bálsamo do Canadá sintético Caedax<sup>®</sup>) e n = 1,53 (bálsamo do Canadá sintético Dinâmica<sup>®</sup>) em animais controles e diabéticos, respectivamente. Os ratos diabéticos mostraram birrefringência de forma um pouco menor, enquanto ambos os animais exibiram birrefringências intrínsecas semelhantes.



**Fig. 3.** Micrografias de luz de campo claro e transmitida polarizada da MOES de ratos dos grupos Controle (A e B) e Diabetes (C e D). Nas micrografias de luz polarizada, as moléculas de polímero iodado do analisador estão direcionadas a 90° em relação àquelas do polarizador e o espécime exibe posição de máxima birrefringência. A

barra no canto inferior esquerdo representa 100 µm. A. Birrefringência de um corte longitudinal não corado de 5 µm de espessura da MOES de um incisivo superior de um rato do grupo Controle. B. Campo claro do corte A, após coloração com HE. C. Birrefringência de um corte longitudinal não corado de 5 µm de espessura da MOES de um incisivo superior de um rato do grupo Diabetes. D. Campo claro do corte C, após coloração com HE. Note que o DMT1 experimental não induziu alterações morfológicas da MOES que pudessem ser detectadas por MLCC e não esteve associada com uma expressiva diminuição do brilho de birrefringência daquela estrutura. Apesar de áreas equivalentes da MOES terem sido avaliadas nos dois grupos, a camada da MOES dos ratos diabéticos mostrou-se mais delgada que aquela observada nos ratos controles. Este achado pode estar relacionado a redução estatisticamente significante nos pesos corpóreos dos ratos diabéticos e com a discreta redução nos valores de retardo ótico exibidos por eles.



**Fig. 4.** Curva de dispersão de birrefringência da MOES de ratos Diabetes e Controle. Retardos óticos (nm) do brilho de birrefringência de cortes não corados de 5 μm de espessura da MOES de incisivos superiores, em função dos índices de refração (n) dos seguintes meios de embebição: água (n = 1,333), solução aquosa de glicerina 80% (n = 1,435), glicerina 100% (n = 1,461), bálsamo do Canadá sintético Dinâmica® (n = 1,53) e bálsamo do Canadá sintético Caedax® (n = 1,56). As mensurações de retardos óticos foram feitas com compensador de Brace-Köhler e luz policromática. Cada ponto na curva representa a média de 5 medidas. Note que os maiores retardos (birrefringência de forma) para as séries de índices de refração corresponderam a n = 1,435 (solução aquosa de glicerina 80%) em ratos controles e diabéticos, e os menores retardos (birrefringência intrínseca) para as séries

de índices de refração corresponderam a n = 1,56 (bálsamo do Canadá sintético Caedax<sup>®</sup>) e n = 1,53 (bálsamo do Canadá sintético Dinâmica<sup>®</sup>) em animais controles e diabéticos, respectivamente. Os ratos diabéticos mostraram birrefringência de forma um pouco menor, enquanto ambos os animais exibiram birrefringências intrínsecas semelhantes.

EEDRX mostrou que a quantidade de cálcio e fósforo na superfície externa do esmalte maduro vestibular foi maior em ratos diabéticos quando comparados aos controles (p = < 0,0001 e p = 0,0063, respectivamente, teste de Mann-Whitney; Tabela 2). No entanto, as razões cálcio/fósforo foram semelhantes em ambos os grupos (p = 0,6511; teste de Mann-Whitney; Tabela 2).

TABELA 2. Quantidades de cálcio e fósforo no esmalte maduro dos grupos Diabetes e Controle. Um aumento estatisticamente significativo destes elementos químicos foi observado no grupo Diabetes. As razões cálcio/fósforo dos dois grupos foram semelhantes.

|          |   | EEDRX                |      |      |                    |          |          |                           |       |       |  |
|----------|---|----------------------|------|------|--------------------|----------|----------|---------------------------|-------|-------|--|
| Grupos   | n | Razão cálcio/fósforo |      |      | Quantidad          | le de cá | lcio (%) | Quantidade de fósforo (%) |       |       |  |
|          |   | Mediana              | q1   | q3   | Mediana            | q1       | q3       | Mediana                   | q1    | q3    |  |
| Controle | 8 | 2,08ª                | 1,94 | 2,27 | 56,85 <sup>b</sup> | 54,49    | 57,58    | 26,52 <sup>d</sup>        | 25,55 | 28,35 |  |
| Diabetes | 8 | 2,16 <sup>a</sup>    | 2,09 | 2,24 | 62,69 <sup>c</sup> | 61,74    | 63,17    | 28,98 <sup>e</sup>        | 42,61 | 29,62 |  |
|          |   | p = 0,6511;          |      |      | p = < 0,0001;      |          |          | p = 0,0063;               |       |       |  |
|          |   | Mann-Whitney test    |      |      | Mann-Whitney test  |          |          | Mann-Whitney test         |       |       |  |

EEDRX = espectrometria de energia dispersiva de raios x; q = quartil. Letras diferentes expressam diferença estatística.

Micrografias eletrônicas de varredura revelaram importantes alterações ultraestruturais na superfície externa do esmalte maduro vestibular de animais diabéticos, exibindo heterogeneidade, contorno irregular e modificações morfológicas erosões, perfurações e descamações quando comparada à superfície externa do esmalte maduro vestibular de animais controles (Fig. 5A, C). O esmalte maduro interno em corte transversal mostrou, por meio de MEV, um padrão irregular de organização e orientação dos bastões, no

qual não foi possível distinguir claramente bastões de regiões interbastões como foi nos espécimes controles (Fig. 5B, D).



**Fig. 5.** Micrografias eletrônicas de varredura do esmalte maduro de incisivos superiores de ratos controles (A, B) e diabéticos (C, D). Os animais controles mostraram superfície externa do esmalte vestibular homogênea, com contorno regular e sem alterações morfológicas (A), e o esmalte maduro interno em corte transversal com padrão regular de organização e orientação dos bastões (B). Importantes alterações ultraestruturais foram observadas nos espécimes de ratos diabéticos, que exibiram na superfície externa do esmalte maduro vestibular contornos irregulares e modificações morfológicas caracterizadas por moderada hipoplasia com depressões de variados tamanhos, formas e profundidades (C), e no esmalte interno em corte transversal um padrão irregular de organização dos bastões perfurados e difícil distinção de bastões e regiões inter-bastões

Regiões internas do esmalte maduro vestibular de ratos diabéticos exibiram redução estatisticamente significante na microdureza a 80  $\mu$ m da JAD quando comparadas a áreas equivalentes nas amostras controles (p = 0,0072; teste t; Tabela 3).

TABELA 3. Valores de microdureza do esmalte maduro (números de microdureza Knoop) dos grupos Diabetes e Controle. Diferença estatística foi observada a 80 μm da JAD.

|          |   | Número de microdureza Knoop do esmalte<br>maduro vestibular interno em corte |            |                     |            |  |  |  |  |
|----------|---|--|------------|---------------------|------------|--|--|--|--|
| Grupos   | n | transversal  |            |                     |            |  |  |  |  |
|          |   | A 40 µm  | da JAD     | A 80 µm da JAD      |            |  |  |  |  |
|          |   | Média  | DP         | Média               | DP         |  |  |  |  |
| Controle | 8 | 279,38 <sup>a</sup>  | 24,93      | 446,13 <sup>b</sup> | 46,61      |  |  |  |  |
| Diabetes | 8 | 281,50 <sup>a</sup>  | 19,78      | 385,13°             | 25,36      |  |  |  |  |
|          |   | p = 0,8573   | 8; teste t | p = 0,007           | 2; teste t |  |  |  |  |

JAD = junção amelodentinária; DP = desvio padrão. Letras diferentes expressam diferença estatística.

# Discussão

Atualização baseada em fatos sobre a biologia estrutural da MOES indica que proteínas intactas do esmalte (amelogeninas, enamelinas e ameloblastinas) e/ou seus produtos de clivagem C-terminais estão presentes apenas na frente de mineralização (próximos aos ameloblastos) e não localizados em camadas do esmalte mais antigas, mais profundas (Bartlett, 2013). Subsequentemente, elas são clivadas por enamelisina (MMP20) e seus produtos proteolíticos N-terminais acumulam-se dentro do esmalte para formar um molde que estabelece forma, tamanho e orientação dos cristalitos em formação (Bartlett, 2013). Uma vez que o fim do estágio de secreção é atingido e as fitas de cristalitos param de crescer em comprimento, a peptidase-4 relacionada à calicreína (KLK-4) é secretada e cliva o molde proteico da matriz do esmalte de modo que ele possa ser exportado do esmalte em

endurecimento e os cristalitos em maturação fusionem-se e formem uma estrutura em bastão coesa (Bartlett, 2013).

Estudos prévios demonstraram que a MOES acima descrita, a qual é principalmente composta por amelogeninas, é fortemente birrefringente à MLTP (do Espírito Santo, Novaes, & Line, 2006). Esta propriedade anisotrópica parece ser desencadeada pela polimerização de nanoesferas de amelogenina e aumentada após clivagem de amelogeninas intactas por MMP20 (Espírito Santo *et al.*, 2007). Interessantemente, alguns relatos mostram que a birrefringência da MOES não é claramente observada próxima aos ameloblastos (onde amelogeninas intactas e/ou seus produtos de proteolíticos C-terminais estão presentes), mas nas camadas mais antigas, mais profundas (onde os produtos de clivagem N-terminais daquelas proteínas estão localizados) (do Espírito Santo *et al.*, 2006; Espírito Santo *et al.*, 2007).

Uma vez que a birrefringência ocorre como consequência da polimerização ordenada de macromoléculas, mudanças nesta propriedade anisotrópica da MOES pode refletir alterações qualitativas e/ou quantitativas na organização supramolecular de seus componentes. Estas modificações podem ser o ponto de partida para interferências em forma, tamanho e orientação dos cristalitos do esmalte em formação, levando a defeitos no esmalte maduro. Portanto, hipotetizou-se que distúrbios na birrefringência da MOES decorrente atividade secretora comprometida dos ameloblastos (como resultado de hiperglicemia e estresse oxidativo) seja um possível mecanismo pelo qual a DMT1 pode causar defeitos no esmalte.

A estreptozotocina tem sido efetiva em demonstrar efeitos deletérios induzidos pelo DMT1 em diversos órgãos e tecidos (Abbassy *et al.*, 2015; Giglio & Lama, 2001; Abbassy, Watari, & Soma, 2008; Deeds *et al.*, 2011) e esta foi a razão do seu uso no presente estudo. Os valores de glicemia do grupo Diabetes induzido por estreptozocina foram superiores a 320 mg/dL e 500% mais altos em comparação aos exibidos pelo grupo Controle (p = < 0,0001; teste t). Estes resultados provam que o DMT1 experimental foi induzido com sucesso. A perda de peso é um sintoma clássico da hiperglicemia (*International Diabetes Federation*, 2015; Katsarou *et al.*, 2017). De fato, os animais diabéticos mostraram aqui uma diminuição expressiva nos pesos corpóreos do dia 14 em diante quando comparados aos controles (p < 0,01; teste de Mann-Whitney ou teste t, de acordo com a variabilidade dos dados; Tabela 1). Estes resultados corroboram os achados recentes relatados por Abbassy *et al.* (2015).

Análise cuidadosa da literatura revela que poucos estudos investigaram os efeitos do DMT1 sobre o desenvolvimento dentário e menos ainda analisaram os mencionados efeitos sobre a formação do esmalte (El-Bialy, Aboul-Azm & El-Sakhawy, 2000; Gutowska *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2001; Norén, 1984; Ozbek, Dural, Kanli, Tuncel, & Orhan, 2009; Silva-Sousa, Peres & Foss, 2003a; Weerheijm, 2004; Yamunadevi *et al.*, 2014; Abbassy *et al.*, 2015; Chałas, Rudzka, Wójcik-Chęcińska & Vodanović, 2016; Atar, Atar-Zwillenberg, Verry & Spornitz, 2004; Silva-Sousa, Peres & Foss, 2003b).

Este é o primeiro estudo que acessa os efeitos do DMT1 experimental sobre a birrefringência da MOES, que apresentou brilho birrefringente nos grupos Diabetes e Controle (Fig. 2; Fig. 3A, C; Fig. 4). Ratos diabéticos não exibiram alterações morfológicas expressivas na MOES como revelaram MLTP e MLCC, mas eles mostraram birrefringência de forma discretamente mais fraca naquela estrutura quando comparados aos animais controles, e ambos os grupos apresentaram birrefringências intrínsecas semelhantes (Figs. 2–4). Ratos controles e diabéticos apresentaram máximo brilho de birrefringência quando os bastões do esmalte estavam orientados a 45° em relação aos filtros polarizador e analisador (Fig. 3A, C). A discreta diminuição nos valores de retardo ótico dos ratos diabéticos pode ser explicada por

uma pequena redução na espessura da MOES daqueles ratos, a qual pôde ser notada por meio de MLCC e MLTP (Fig. 3A, B, C, D). Estes achados podem em parte ser explicados pela grande redução do peso dos animais diabéticos (ao dia 54, eles exibiam aproximadamente 60% do peso dos ratos controles; Tabela 1) e estão de acordo com relatos prévios de diminuição da espessura da camada de esmalte (maduro e em fase de secreção) decorrente do diabetes, cuja hiperglicemia característica poderia interferir na atividade ameloblástica (Silva-Sousa, Peres & Foss, 2003a; Abbassy et al., 2015). De fato, existe prévia associação de MOES mais delgada com redução de retardo ótico do brilho de birrefringência (Espírito Santo et al., 2007). Apesar destas pequenas alterações na morfologia e na anisotropia da MOES de animais diabéticos, os resultados aqui apresentados indicam que o DMT1 experimental não induziu importantes alterações nas propriedades de agregação da MOES e na orientação de seus componentes.

EEDRX mostrou que a quantidade de cálcio e fósforo no esmalte maduro vestibular mais externo foi 9,3% maior (p = < 0,0001; teste de Mann-Whitney; Tabela 2) e 8,4% superior (p = 0,0063; teste de Mann-Whitney; Tabela 2) em ratos diabéticos comparados aos controles. No entanto, as razões cálcio/fósforo foram semelhantes nos dois grupos (p = 0,6511; teste de Mann-Whitney; Tabela 2). Nossos achados na quantidade de cálcio e fósforo dos ratos diabéticos não estão de acordo com evidências prévias relatadas por alguns autores (Atar, Atar-Zwillenberg, Verry, & Spornitz, 2004; Gutowska et al., 2011). No entanto, um aumento de 8–9 % pode não ser clinicamente relevante, desde que existem importantes publicações sobre o aumento da incidência de cáries em crianças com DMT1 (Siudikiene, Machiulskiene, Nyvad, Tenovuo, & Nedzelskiene, 2006; Siudikiene, Machiulskiene, Nyvad, Tenovuo, & Nedzelskiene, 2008).

Em contraste com os achados de MLCC e MLTP, o DMT1 experimental induziu importantes alterações ultraestruturais no esmalte maduro vestibular interno e mais superficial, como revelado por MEV (Fig. 5). Estes resultados estão de acordo com os estudos de Silva-Sousa, Peres e Foss (2003a), e de Atar, Atar-Zwillenberg, Verry e Spornitz (2004), mostrando expressivos defeitos na ultraestrutura do esmalte maduro de dentes extraídos de ratos que haviam sido submetidos ao diabetes experimental. Este também é o primeiro estudo que acessa microdureza do esmalte maduro em dentes de animais diabéticos. Testes de microdureza do esmalte maduro vestibular interno em corte transversal mostrou que o DMT1 experimental tinha induzido uma redução estatisticamente significativa de 13,67% na microdureza daquela estrutura a 80  $\mu$ m da JAD (p = 0,0072; teste t; Tabela 3). Estes resultados estão possivelmente relacionados com nossos achados revelados por MEV e podem ser de interesse para a área de Cariologia, uma vez que a mencionada diminuição de microdureza ocorreu próximo ao esmalte maduro vestibular superficial (destaque-se que a espessura da camada do esmalte de rato é de aproximadamente 100 μm). No entanto, é importante enfatizar que a importância clínica de nossos resultados obtidos por MEV e teste de microdureza deve ser investigada, explorando por exemplo a resistência do esmalte maduro de ratos diabéticos aos ácidos liberados por bactérias cariogênicas.

# Conclusões

O presente estudo indica que o DMT1 pode interferir no desenvolvimento do esmalte, levando a alterações nas propriedades ultraestruturais e mecânicas do esmalte maduro, as quais podem aumentar a suscetibilidade à cárie.

# Agradecimentos

Nós agradecemos ao Prof. Dr. Jaime A. Cury do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas – UNICAMP, pelo uso do microdurômetro. Agradecemos também a Adriano L. Martins, Eliene A. N. Romani e Maria A. Varela pela importante assistência técnica.

# Financiamento

Este estudo é parte da dissertação de mestrado da primeira autora (Bruna Larissa Lago Silva), que foi contemplada com uma bolsa da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, e compreende parte de um projeto de pesquisa financiado pela Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB (PPP0065/2010).

# Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse e que são os únicos responsáveis pelo conteúdo e redação do artigo.

# Referências

Abbassy, M. A., Watari, I., & Soma, K. (2008). Effect of experimental diabetes on craniofacial growth in rats. Archives of Oral Biology, 53, 819–825.

- Abbassy, M. A., Watari, I., Bakry, A. S., Hamba, H., Hassan, A. H., Tagami, J., et al. (2015). Diabetes detrimental effects on enamel and dentine formation. *Journal of Dentistry*, 43, 589–596.
- Atar, M., Atar-Zwillenberg, D. R., Verry, P., & Spornitz, U. M. (2004).
   Defective enamel ultrastructure in diabetic rodents. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 14, 301–307.
- Bartlett, J. D. (2013). Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *International Scholarly Research Network Dentry*, 2013, PMC3789414.
- Chałas, R., Rudzka, O., Wójcik-Chęcińska, I., & Vodanović, M. (2016). The impact of type 1 diabetes on he development of the craniofacial mineralised tissues (bones and teeth): literature review. *Folia Morphologica*, 75, 275–280.
- Deeds, M. C., Anderson, J. M., Armstrong, A. S., Gastineau, D. A., Hiddinga, H. J., Jahangir, A., et al. (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. Laboratory Animals, 45, 131–140.
- do Espírito Santo, A.R., Novaes, P.D., & Line S.R. (2006). Anisotropic properties of the enamel organic extracellular matrix. *European Journal of Oral Sciences*, 114 Suppl 1, 333–337.
- El-Bialy, T., Aboul-Azm, S. F., & El-Sakhawy, M. (2000). Study of craniofacial morphology and skeletal maturation in juvenile diabetics (type I). *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 118, 189–195.
- Ellwood, R. P., & O'Mullane, D. (1996). The association between developmental enamel defects and caries in populations with and without fluoride in their drinking water. *Journal of Public Health Dentistry*, 56, 76–80.
- Espírito Santo, A. R., Bartlett, J. D., Gibson, C. W., Li, Y., Kulkarni, A. B. & Line S. R. (2007). Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in

the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. *Connective Tissue Research*, 48, 39–45.

- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107, 1058–1070.
- Giglio, M. J., & Lama, M. A. (2001). Effect of experimental diabetes on mandible growth in rats. *European Journal of Oral Sciences*, 109, 193–197.
- Gutowska, I., Baranowska-Bosiacka, I., Rybicka, M., Noceń, I., Dudzińska, W., Marchlewicz, M., et al. (2011). Changes in the concentration of microelements in the teeth of rats in the final stage of type 1 diabetes, with an absolute lack of insulin. *Biological Trace Element Research*, 139, 332–340.
- International Diabetes Federation. (2015). *IDF diabetes atlas*. Belgium: IDF. http://www.diabetesatlas.org/component/attachments/?task=download&id=116.
- Katsarou, A., Gudbjörnsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., et al. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, article number 17016, 1–17.
- Modesto, A., Klein, O., Tenuta, L. M., Gerlach, R. F. & Vieira, A. R. (2013). Summary of the IADR Cariology Research, Craniofacial Biology, and Mineralized Tissue Groups Symposium, Iguaçu Falls, Brazil, June 2012: Gene-environment Interactions and Epigenetics in Oral Diseases: Enamel Formation and its Clinical Impact on Tooth Defects, Caries, and Erosion. *Dentistry 3000*, 1, pii:http://dentistry3000.pitt.edu/ojs/inde, PMC4225817.
- Moore, P. A., Weynant, R. J., Etzel, K. R., Guggenheimer, J., Mongelluzzo, M. B., Myers, D. E., et al. (2001). Type 1 diabetes mellitus and oral health: assessment of coronal and root caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 29, 183–194.

- Nelson-Filho, P., Lucisano, M.P., da Silva, R.A., da Silva, R.S., Serra, M.C., Gerlach, R.F., et al. (2012). Systemically alendronate was incorporated into dental tissues but did not cause morphological or mechanical changes in rats teeth. *Microscopy Research Technique*, 75, 1265–1271.
- Norén, J. G. (1984). Microscopic study of enamel defects in deciduous teeth of infants of diabetic mother. *Acta Odontologica Scandinavica*, 42, 153–156.
- Ozbek, M., Dural, S., Kanli, A., Tuncel, M., & Orhan, K. (2009). Morphological evaluation of rat incisor enamel and dentin induced by pregnancy and lactation using a scanning electron microscope. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71, 1273–1277.
- Paneni, F., Beckman, J. A., Creager, M. A., & Cosentino, F. (2013). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *European Heart Journal*, 34, 2436–2443.
- Silva-Sousa, Y. T., Peres, L. C., & Foss M. C. (2003a). Enamel hypoplasia in a litter of rats with alloxan-induced diabetes mellitus. *Brazilian Dental Journal*, 14, 87–93.
- Silva-Sousa, Y. T., Peres, L. C., & Foss, M. C. (2003b). Are there structural alterations in the enamel organ of offspring of rats with alloxan-induced diabetes mellitus? *Brazilian Dental Journal*, 14, 162–167.
- Siudikiene, J., Machiulskiene, V., Nyvad, B., Tenovuo, J., & Nedzelskiene I. (2008). Dental caries increments and related factors in children with type 1 diabetes mellitus. *Caries Research*, 42, 354–362.
- Siudikiene, J., Machiulskiene, V., Nyvad, B., Tenovuo, J., & Nedzelskiene I. (2006). Dental caries and salivary status in children with type 1 diabetes mellitus, related to the metabolic control of the disease. *European Journal of Oral Sciences*, 114, 8–14.

- Smith, C.E. & Nanci, A. (1989). A method for sampling the stages of amelogenesis on mandibular rat incisors using the molars as a reference for dissection. *Anatomical Record*, 225, 257–266.
- Thesleff, I., Vaahtokari, A., Kettunen, P. & Aberg, T. (1995). Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res*, 32, 9–15.
- Weerheijm, K. L. (2004). Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. *Dental Update*, 31, 9–12.
- World Health Organization. (1999). *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultation. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Genewa: WHO.
- Yamunadevi, A., Basandi, P. S., Madhushankari, G. S., Donoghue, M., Manjunath, A., Selvamani, M., et al. (2014). Morphological alterations in the dentition of type I diabetes mellitus patients. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 6, 122–126.

# 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

.

O presente estudo indica que a DMT1 pode afetar o desenvolvimento do esmalte, levando a alterações das propriedades ultraestruturais e mecânicas do esmalte maduro, que podem aumentar a suscetibilidade a cáries.

### ANEXO



Universidade Federal da Bahia Instituto de Ciências da Saúde (ICS) Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número **007/2010**, intitulado "Efeitos do diabetes mellitus tipo **1** e do pamidronato dissódico sobre a formação do esmalte dentário", sob a responsabilidade do Professor Alexandre Ribeiro do Espírito Santo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **12 de agosto de 2010**.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol number **007/2010**, entitled "Effects of type 1 diabetes **mellitus and disodium pamidronate on dental enamel formation**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). This project was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use from the Institute of Health Sciences (CEUA-ICS, Federal University of Bahia - UFBA) on **August 12, 2010**.

Salvador, 12 de agosto de 2010

Frof<sup>a</sup> Dra. Songeli Menezes Freire

Prof<sup>a</sup> Dra. Songeli Menezes Freire Presidente da CEUA-ICS

CEUA-ICS Av. Reitor Miguel Calmon, s/n Vale do Canela – Salvador-BA CEP: 40.110-902 Telefone: (71) 3283-8958 Telefax: (71) 3245-0917 E-mail: <u>ceuals@utb\_br</u> http://www.moodle.ufba.br/course/view.php?id=10332