

FORMAÇÃO DE *CROSSLINKS* ANORMAIS EM COLÁGENO DA DENTINA RADICULAR EM DIABETES MELLITUS TIPO 2

Abnormal crosslink formation in root dentin collagen in type 2 Diabetes
Mellitus

 Mariana Carreiro Costa de Lima^a

 Isabela Monici Silva^a

 Bruna Leis Endres^a

 Sebastião William da Silva^b

 Maria do Carmo Machado Guimarães^a

 Naile Dame-Teixeira^a

^aDepartamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília – DF, Brasil

^bInstituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília – DF, Brasil

Autor de correspondência: Naile Dame-Teixeira E-mail: nailedame@unb.br

Data de envio: 11/12/2024 **Data de aceite:** 28/11/2025



RESUMO

Objetivos: Estudar o colágeno da dentina radicular em pessoas com diabetes, buscando possíveis alterações químicas devido a reações causadas pela hiperglicemia. **Materiais e Métodos:** Seis raízes de dentes extraídos, três de indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e três controles normoglicêmicos, foram preparadas para o exame de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR – ATR), gerando espectros de três pontos na face interna e três na externa, totalizando 36 espectroscopias. Os resultados foram analisados por Análise de Componentes Principais (PCA). Também foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterização das superfícies. **Resultados:** Houve distinção entre alguns picos (amidas, carbonato e fosfato), o que pode sugerir diferentes ligações moleculares (*crosslinks* anormais) decorrentes do acúmulo de produtos finais de glicação avançada (em inglês, *Advanced glycation end products* - AGEs) devido à hiperglicemia. Porém não foi possível separar os padrões de espectrometria por grupo controle vs. diabético por meio dos componentes principais (PCs) gerados a partir dos espectros de infravermelho. Houve uma tendência, em uma das comparações entre PCs, de separação do grupo diabético externo. Imagens de MEV ilustraram túbulos dentinários nas amostras. **Discussão:** A tendência de separação do grupo diabético externo sugere alguma alteração na composição química do tecido dentário nessa condição, que pode estar associada às mudanças nos picos de amida, carbonato e fosfato, e necessita mais estudos. **Conclusão:** Apesar de alguns picos alterados, ainda não foi possível concluir que há formação de *crosslinks* anormais na dentina radicular em DM tipo 2, pois o padrão de espectrometria não diferenciou as amostras controles e diabéticas.

Palavras-chave: Colágeno; Dentina; Diabetes mellitus; Hiperglicemia.

ABSTRACT

Aim: To study root dentin collagen in individuals with diabetes, searching for possible chemical alterations due to reactions caused by hyperglycemia. **Materials and**

Methods: Six extracted teeth roots, three from individuals with type 2 Diabetes Mellitus and three normoglycemic controls, were prepared for Fourier transform infrared spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FTIR – ATR) examination, generating spectra of three points on the internal face and three on the external face, totaling 36 spectroscopies. Results were analyzed by Principal Component Analysis (PCA). Scanning electron microscopy (SEM) was also performed to characterize the surfaces.

Results: There was a distinction between some peaks (amides, carbonate and phosphate), which may suggest different molecular bonds (abnormal crosslinks) resulting from accumulation of Advanced Glycation End Products (AGEs) due to hyperglycemia. However, it was not possible to separate the spectrometry patterns by control vs. diabetic group through the principal components (PCs) generated from infrared spectra. There was a tendency, in one of the comparisons between PCs, for separation of the external diabetic group. SEM images illustrated dentinal tubules in samples. **Discussion:** The tendency for separation of the external diabetic group suggests some alteration in the chemical composition of the dental tissue in this condition, which may be associated with changes in amide, carbonate and phosphate peaks, and requires further studies. **Conclusion:** Despite some altered peaks, it was not possible yet to conclude that there is formation of abnormal crosslinks in root dentin in type 2 DM, since spectrometry pattern did not differentiate control and diabetic samples.

Keywords: Collagen; dentin; Diabetes mellitus; Hyperglycemia.

INTRODUÇÃO

Com a tendência do envelhecimento da população global, é percebido um aumento na prevalência de doenças crônicas, como a Diabetes Mellitus (DM)¹. Segundo a Federação Internacional de Diabetes, cerca de 537 milhões de adultos viviam com DM em 2021², sendo cerca de 90% correspondente ao DM tipo 2³. A fisiopatologia da DM tipo 2 envolve a resistência adquirida à insulina, gerando a hiperglicemia³.

Pacientes com DM podem apresentar manifestações orais decorrentes da hiperglicemia e das mudanças no ambiente bucal. Ao reduzir o fluxo salivar e aumentar a glicose salivar, disbioses no microbioma oral são esperadas^{4,5}, como a doença periodontal, comum nessa população⁶⁻⁹. Sua consequente exposição radicular pode gerar um maior risco de cárie radicular¹⁰. Lima *et al.* mostraram maior número de dentes afetados por cárie em indivíduos com DM comparados ao grupo sem DM, além de indivíduos com DM tipo 2 apresentarem probabilidade três vezes maior de ter lesões de cárie radicular¹¹. As razões para essa associação entre DM e cárie radicular são diversas, sendo a hipossalivação a mais comumente relatada na literatura¹². Além da hipossalivação associada ao DM¹², um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa também demonstrou uma correlação positiva entre índices glicêmicos séricos e um maior número de lesões cariosas radiculares¹³. Porém, não se descarta que alguma alteração dos próprios tecidos radiculares possa explicar tal relação DM vs. cárie radicular, como a formação de *crosslinks* anormais nas estruturas.

Entretanto, não há nenhuma informação se o colágeno dentinário poderia ser afetado pela formação de *crosslinks*. Os longos períodos de hiperglicemia nas pessoas que vivem com DM levam ao desenvolvimento de produtos finais de glicação avançada³ (em inglês, conhecidos pela sigla AGEs – *Advanced glycation end products*), compostos gerados por uma reação não enzimática de redução entre açúcares e grupos aminas, e que acumulam nas proteínas de meia vida longa no organismo no decorrer dos anos¹⁴. A formação de AGEs leva a ligações cruzadas (*crosslinks*) em proteínas como o colágeno, promovendo alterações nas propriedades do tecido, como o enrijecimento da fibrila colágena¹⁵. O colágeno de diabéticos

demonstrou apresentar maior quantidade de *crosslinks* em outros tecidos como a pele, e consequente, menor solubilidade e menor digestibilidade por colagenase¹⁶⁻¹⁸, o que prejudica sua renovação tecidual e mantém um tecido envelhecido e de menor qualidade. Considerando que o colágeno é principal componente da matriz orgânica da dentina, esta poderia ser alterada nessas condições.

Diante do reconhecimento de que a glicação do colágeno pode alterar a estrutura dentinária, busca-se investigar a possível associação entre a formação de *crosslinks* na dentina de indivíduos com DM. Essa modificação estrutural pode representar um fator adicional a ser considerado na relação entre DM e cárie radicular. O presente estudo tem como objetivo analisar a dentina radicular de indivíduos com DM tipo 2, em comparação com controles normoglicêmicos, a fim de verificar a ocorrência de *crosslinks* anormais nessa matriz.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos doadores

Este é um estudo *ex vivo* aninhado a uma coorte prospectiva, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, com parecer de número 5.468.896. Todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e foram convidados a receber tratamento odontológico na Unidade de Saúde Bucal do Hospital Universitário de Brasília – USBUC/HUB.

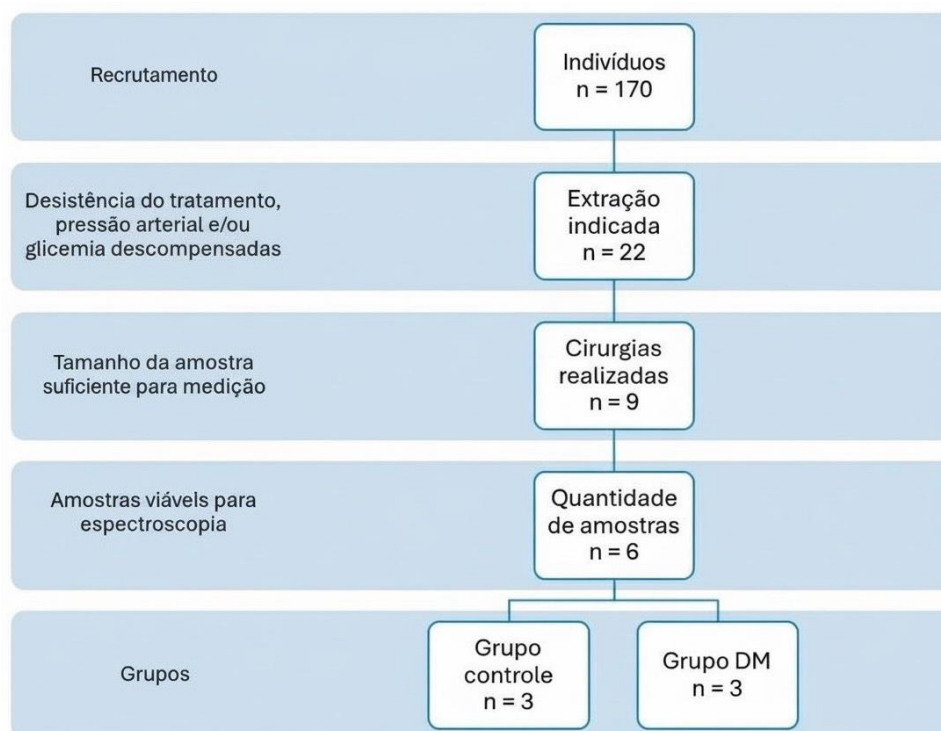
De março a novembro de 2023, 170 participantes foram recrutados para a coorte, sendo incluídos adultos dentados acima de 35 anos de idade. Os critérios de exclusão da pesquisa compreendiam os indivíduos com: Diabetes Mellitus tipo 1; mulheres grávidas ou lactantes; receptores de transplantes; história de epilepsia; síndrome de Sjogren; Lupus; doença de Crohn; HIV; doença celíaca; tratamento quimioterápico ou radioterápico em cabeça e pescoço nos últimos três meses; pessoas com deficiências físicas que impedem a medição de altura e/ou peso e circunferência da cintura em pé, como paralisia cerebral, paraplegia e tetraplegia.

As variáveis coletadas dos participantes incluíram anamnese [de acordo com Patient-centred Outcomes for Adult Oral Health¹⁹ e com o Core Outcomes Diabetes SCORE-IT²⁰] e exames de sangue [hemoglobina glicada (HbA1c) e glicemia em

jejum]. Detalhes dos exames clínicos foram previamente descritos²¹. Brevemente, os exames incluíram exame periodontal completo, com registros de profundidade de sondagem, presença de cálculo e mobilidade, exame de experiência de cárie, com registros de presença e atividade de lesões de cárie. Os examinadores foram treinados e calibrados para tal.

A partir dos 170 participantes recrutados na coorte, foram identificados 22 indivíduos com indicação de uma ou mais extrações dentárias. Destes, 9 foram submetidos a exodontias e doaram as amostras dentárias para realização da presente pesquisa. Após etapa de preparos, 6 amostras dentárias (sendo 3 de pessoas com DM e 3 de normoglicêmicos) apresentaram viabilidade para serem analisadas (Figura 1). A definição dos grupos controle e DM foi por meio de autorrelato de diagnóstico médico de DM, como previamente descrito em Alves et al.²

Figura 1 - Fluxograma de indivíduos e doadores de amostras, desde o recrutamento até a realização dos testes de Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR).



Coleta das amostras

Foram coletados dentes extraídos (aqui denominados “amostras dentárias”) de 3 doadores com DM tipo 2 e de 3 doadores normoglicêmicos que constituíram um grupo controle.

Os dentes extraídos apresentavam indicação de extração, avaliada por especialistas. A decisão de tratamento iniciou-se durante o recrutamento com auxílio de especialistas em dentística, periodontia e endodontia, e era confirmada no momento da cirurgia.

As extrações possuíam indicação devido a fraturas, presença de lesões de cárie e doença periodontal avançadas. A cirurgia convencional compreendia os seguintes passos: anestesia local, descolamento/sindesmotomia, incisão e rebatimento de retalho quando necessidade de realização de técnica aberta, luxação, remoção do dente, irrigação, curetagem, sutura e orientações pós-operatórias. Os procedimentos foram realizados pelos estudantes da graduação em Odontologia. Os dentes foram armazenados em recipiente com solução de cloramina a 0,5% assim que a cirurgia era finalizada.

Armazenamento das amostras

Para descontaminação inicial e controle de infecção cruzada, as amostras foram armazenadas em solução de cloramina a 0,5%, preparada com diluição em água destilada, por 24 horas. Após esse período, as amostras foram mantidas, a seco, em -80°C até a realização do preparo.

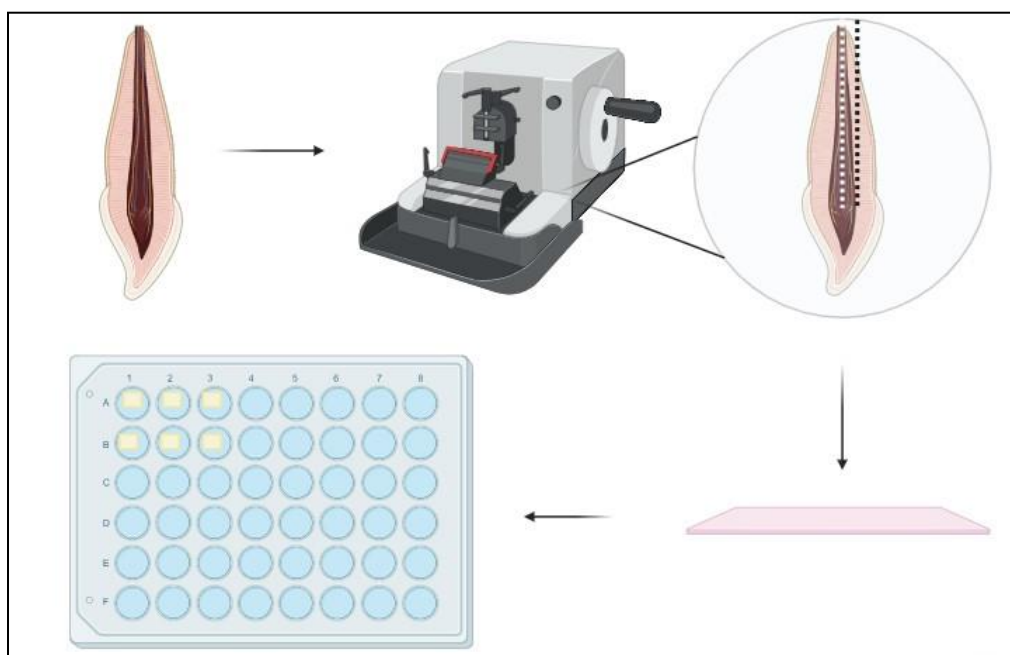
Preparo das amostras

Foi realizada uma raspagem na intenção de remover remanescentes do ligamento periodontal, utilizando-se de curetas periodontais. Em seguida, foram realizados dois cortes em cada amostra dentária no sentido cérvico-apical, contemplando a região do canal radicular e uma região lateralmente ao corte inicial. Obteve-se, assim, uma lâmina dentária de espessura de cerca de 0,5mm (Figura 2). Foram analisadas duas porções distintas da dentina: (i) a porção externa, exposta ao meio bucal e em contato com a saliva hiperglicêmica e açúcares da dieta, suscetível

a alterações estruturais decorrentes dessa exposição local; e (ii) a porção interna, voltada para a cavidade pulpar, constituída por dentina secundária formada ao longo da vida, inclusive durante períodos de hiperglicemia, o que pode influenciar sua composição e organização estrutural durante a formação do tecido.

Os cortes foram executados utilizando-se de uma cortadeira metalográfica de precisão do tipo *Micromet Evolution (Lapmaster, Germany)* do Laboratório de Pesquisa em Dentística e Materiais Dentários da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As amostras foram armazenadas em água destilada, tanto após o preparo quanto entre as análises abaixo descritas.

Figura 2 - Imagem ilustrativa do esquema de cortes realizados em cada amostra dentária



Legenda:

A imagem do esquema de cortes realizados em cada amostra dentária gera uma lâmina com uma face voltada para o canal radicular e outra face voltada para a cavidade oral. As lâminas foram acondicionadas em placas de poços contendo água destilada, entre os experimentos, garantindo armazenamento adequado e identificação correta dos espécimes.

Análises por espectroscopia de infravermelho

O desfecho principal foi a análise da estrutura química do colágeno dentinário nas lâminas dentárias obtidas por meio do exame de Espectroscopia de Infravermelho

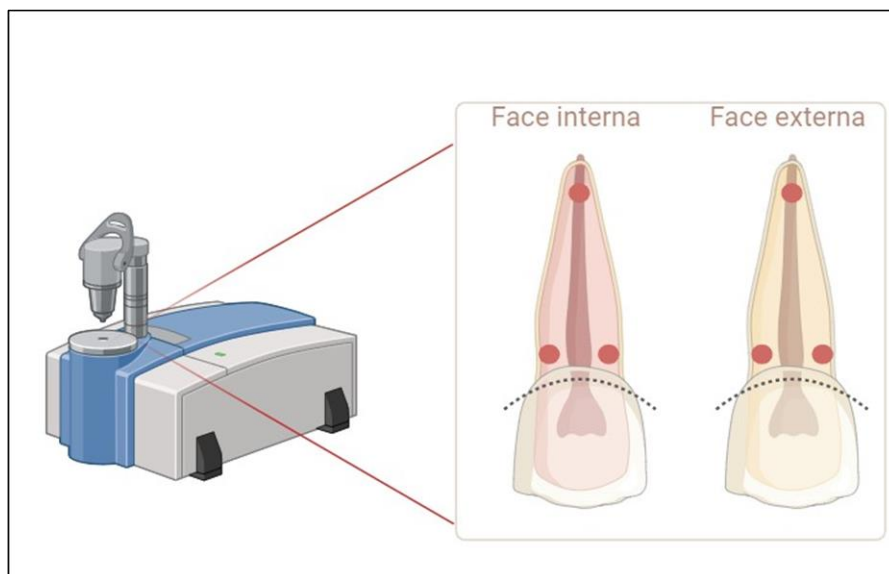
transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR). A técnica permite avaliar a formação de *crosslinks* anormais na dentina radicular a partir de picos em região referentes à matéria orgânica. O teste foi realizado em espectrômetro FTIR, Bruker (Billerica, Massachusetts), Vertex 70, equipado com ATR, do Laboratório de Espectroscopia Óptica do Instituto de Física da Universidade de Brasília, com número de scans igual a 96, intervalo de espectro de 350 a 4500 cm^{-1} e resolução de 2 cm^{-1} . Houve padronização do pico da água e realização de backgrounds entre amostras.

Foram medidos espectros em três pontos em cada uma das duas faces das lâminas dentárias (interna – voltada para o canal radicular - e externa – voltada para a cavidade oral, oposta à anterior). A seleção dos pontos de medição foi realizada de modo a abranger diferentes contextos de influência sobre a dentina radicular. Nos níveis cervicais, as análises na face externa e interna possibilitaram avaliar a região mais exposta ao meio bucal. As medições no terço apical representaram uma área menos exposta, servindo como contraste em relação às regiões cervicais e permitindo investigar possíveis gradientes químicos ao longo da raiz. Assim, obteve-se seis pontos por lâmina dentária, totalizando 36 espectroscopias (Figura 3).

Após medidas dos espectros, foi realizado o tratamento de dados utilizando-se do software LabScape. A análise estatística foi feita por meio de Análise de Componentes Principais (PCA) para avaliar a correlação entre os diferentes grupos e espectros, utilizando-se do programa MiniTab (Pensilvânia). A importação dos dados dos espectros foi obtida por meio do software OriginPro 9 (OriginLab, Massachusetts).

A análise das prováveis modificações na estrutura química do colágeno da dentina radicular seria por meio da observação de alterações nas regiões com presença de fosfato, carbonato, amida 1 e amida 2, relacionadas às mudanças que podem alterar e prejudicar a qualidade tecidual e à presença de *crosslinks* anormais.

Figura 3 - Esquema ilustrativo dos pontos onde foram realizadas as espectroscopias no FTIR-ATR



Legenda:

São 2 pontos cervicais e 1 ponto apical em cada face – interna e externa -, totalizando 6 medidas por amostra.

Análise por microscopia eletrônica de varredura

Além da análise química, foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) como desfecho secundário, no Laboratório de Microscopia e Microanálise, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília. O objetivo foi analisar qualitativamente as superfícies das lâminas dentárias obtidas, tanto a superfície voltada para o canal radicular como a superfície voltada para o meio bucal. O preparo das amostras para a microscopia foi realizado com fixação por glutaraldeído com paraformaldeído por 2 horas (para fixar proteínas) seguido do tampão cacodilato de sódio por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram imersas em tetróxido de ósmio, pós fixador que se liga a lipídeos, protegendo-as da luz. Depois, foi realizada lavagem com água destilada e desidratação das amostras com acetona a 50%, 70%, 90% e 100%, cada uma das concentrações agindo por 10 minutos, sendo a acetona a 100% colocada 2 vezes. Para secagem da amostra, seguiu-se com banhos de CO₂ líquido, utilizando-se de um aparelho de secagem a ponto crítico CPD 030 (*Balzers, Lab X, Massachusetts*) por 20 minutos. Por fim, antes da microscopia em si, as amostras passam por um metalizador SCD 500 (*Leica, Germany*) durante 1 minuto.

Para realização da microscopia, as amostras eram mantidas em vácuo até pressão adequada. Em seguida, foi possível visualizar e capturar as imagens geradas e desejadas. A MEV foi realizada em microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo, modelo *JSM-7001F (JEOL, Boston)*. A voltagem de aceleração foi de 15Kv e a corrente de emissão de 61,2 μ A.

Devida necessidade de fixação imediata dos espécimes após a extração, o que prejudicaria a análise de FTIR, amostras extras foram exclusivamente extraídas para realizar a visualização dos componentes na MEV. As amostras passaram pelo mesmo processo de fixação imediatamente após procedimento de descontaminação, ambos previamente descritos, com a diferença de aplicação de ácido fosfórico após realização dos cortes para remoção da camada de *smear layer* formada durante a obtenção da lâmina dentária, para melhor visualização das imagens na microscopia.

RESULTADOS

Os doadores das amostras apresentavam idades entre 36 a 61 anos, sendo quatro do sexo masculino e dois do sexo feminino. Entre os seis doadores iniciais, três não possuem o hábito de fumo, dois são fumantes e um afirma já ter fumado. Quanto ao tempo de diagnóstico, a maioria apresentou diagnóstico de DM em torno de 5 anos, enquanto dois tinham diagnóstico da doença há mais de dez anos. Os três doadores de amostras usadas no FTIR-ATR, pertencentes ao grupo DM, eram insulino-dependentes. Mais detalhes por doador encontram-se na Tabela 1.

Quanto aos índices glicêmicos dos indivíduos, os doadores do grupo controle possuíam HbA1c igual ou abaixo de 5,6% (média 5.5% $\pm$ 0.1%), enquanto o grupo diabético apresentou valores médios de 6.9% $\pm$ 1.9%. Quanto à glicose em jejum, os doadores do grupo controle apresentaram valores médios de 94.3 $\pm$ 4.2 mg/dL, enquanto no grupo diabético, os valores corresponderam a 112.7 $\pm$ 42.5 mg/dL. Já quanto à glicemia capilar, os valores foram de 94.3 $\pm$ 4.7 mg/dL nos doadores do grupo controle e de 105.0 $\pm$ 42.1mg/dL nos doadores com DM tipo 2. Por fim, os indivíduos do grupo diabético apresentaram valores de insulina em jejum (21.3 $\pm$ 7.2 uU/mL) maiores que os do grupo controle (12.9 $\pm$ 0.9 uU/mL). Além das amostras dentárias submetidas ao FTIR-ATR, outras duas amostras extras foram coletadas

posteriormente para a realização da MEV (doadores 7 e 8). Ambos os doadores apresentavam diagnóstico de DM tipo 2, sendo um do sexo feminino e um do sexo masculino, e de idades correspondentes a 57 e 38 anos, respectivamente. Os índices glicêmicos séricos dos doadores foram obtidos a partir de exame de sangue e encontram-se representados por doador na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados coletados durante etapa de recrutamento dos pacientes e índices glicêmicos séricos dos doadores

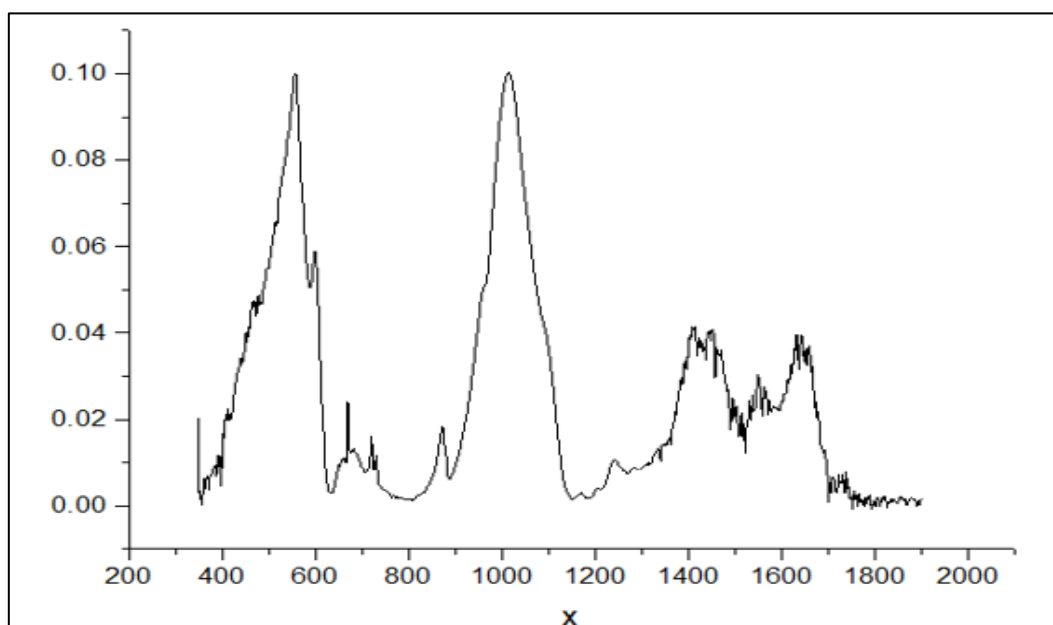
, sem ponto	Grupo	Idade	Sexo	Fumo	Tempo de Diagnóstico	Diabetes Controlada	Hemoglobina glicada (HbA1c)	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicemia capilar (mg/dL)	Insulina em jejum (uU/mL)
Doador 1	Controle	36	Masculino	Não	-	-	5,6%	99	96	13,44
Doador 2	Controle	37	Feminino	Sim	-	-	5,5%	93	98	13,36
Doador 3	Controle	58	Masculino	Já fumou	-	-	5,4%	91	89	11,8
Doador 4	Diabético	44	Feminino	Não	2 anos	Sim	5,9%	104	107	28,61
Doador 5	Diabético	61	Masculino	Sim	3 anos	Sim	5,8%	103	99	30,91
Doador 6	Diabético	51	Masculino	Não	10 anos	Às vezes	5,7%	94	82	17,17
Doador 7*	Diabético	57	Feminino	Já fumou	7 anos	Sim	7,9%	198	187	12,44
Doador 8*	Diabético	38	Masculino	Não	17 anos	Sim	10,4%	83	73	21,56

Legenda:

Amostras extras utilizadas exclusivamente para Microscopia Eletrônica de Varredura. Os valores de referência de glicemia seguiram as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes vigentes no período do estudo. Foram considerados normoglicêmicos os indivíduos com HbA1c < 6,5 % ou glicemia de jejum (plasma venoso) < 126 mg/dL. A glicemia capilar foi utilizada apenas como medida auxiliar de monitoramento.

A partir das medições realizadas por FTIR-ATR nas lâminas dentárias, eram gerados espectros referentes a cada ponto mostrado na figura 3. Como exemplo, a figura 4 ilustra o espectro gerado a partir do ponto apical externo da amostra dentária do doador 1, ou seja, na porção apical da face oposta à voltada para o canal radicular.

Figura 4 - Exemplo de espectro gerado a partir da medição por FTIR-ATR do ponto apical externo da amostra dentária do doador 1

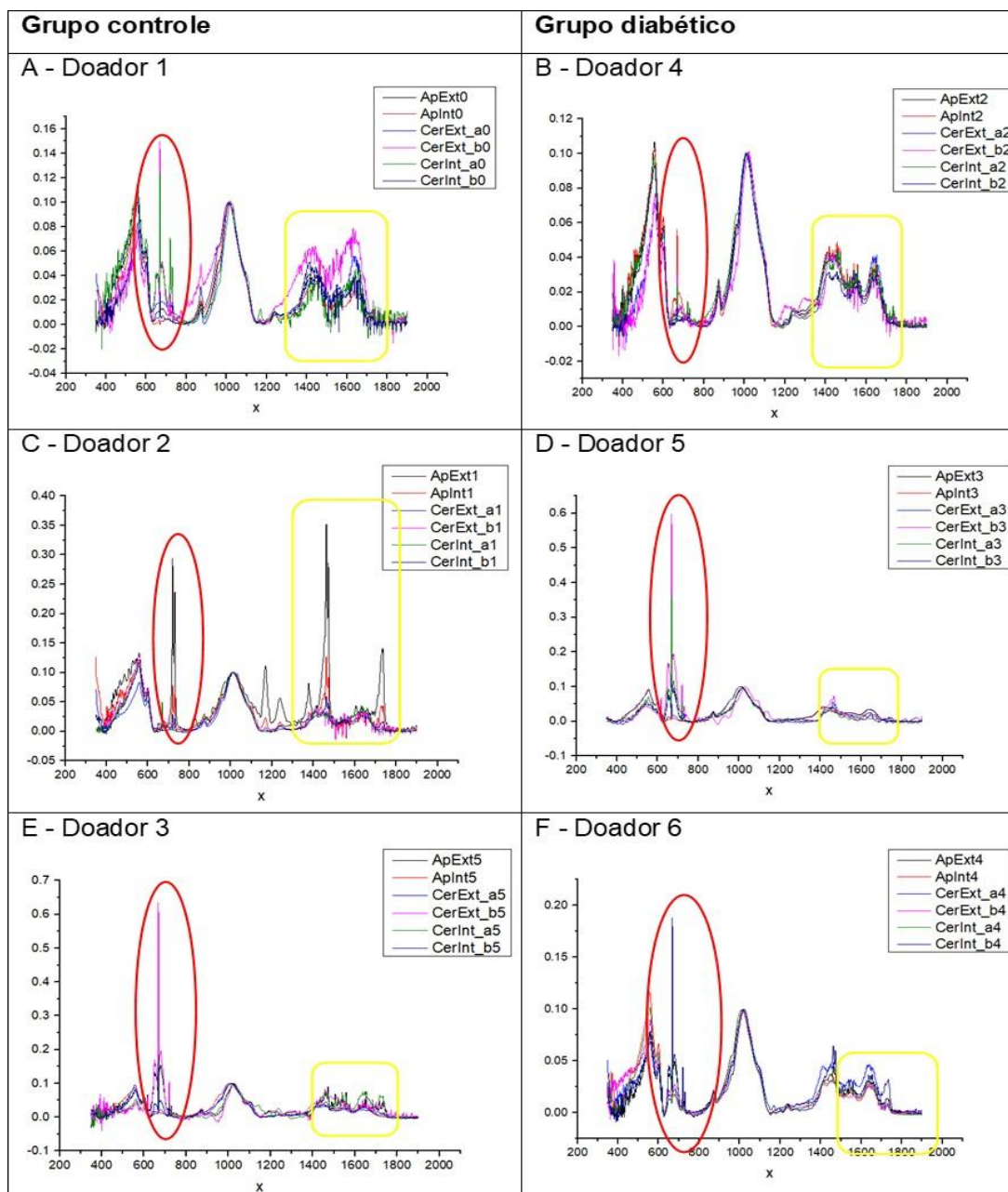


Legenda:

Espectro pertencente ao grupo controle (eixo x: comprimento de onda (cm⁻¹); eixo y: intensidade de luz infravermelha (transmitância)).

Como explicado anteriormente, cada amostra era submetida a três pontos de medição no FTIR-ATR, sendo que cada lâmina gerou seis espectros. A figura 5 apresenta os seis espectros obtidos de cada uma das seis amostras (A-F). Ao comparar os 36 gráficos de FTIR-ATR gerados, observou-se que os picos que mais apresentaram variação entre os espectros se localizavam nas regiões entre os comprimentos de onda de 600 a 800 cm⁻¹ (círculos vermelhos) e de 1400 a 1800 cm⁻¹ (quadrados amarelos). Nessas regiões, há presença de fosfato (círculo vermelho) e carbonato (quadrado amarelo), associados a alterações na maturação e mineralização tecidual, e dos picos de amida 1 e amida 2, compostos relacionados à presença de *crosslinks* anormais derivados de AGEs.

Figura 5 - Espectros de FTIR-ATR



Legenda:

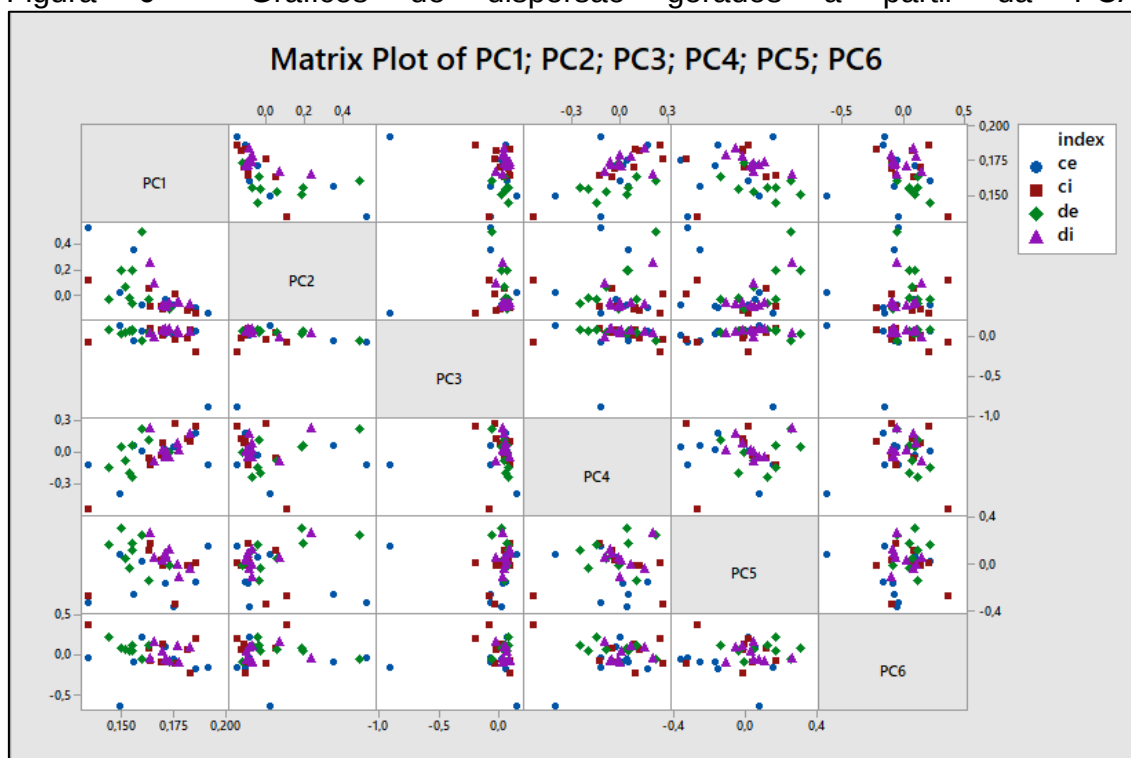
Espectros de FTIR-ATR gerados para as seis amostras dentárias obtidas dos doadores do grupo controle e diabético (círculo vermelho: região entre 600 a 800cm⁻¹ com variação da intensidade de picos entre os diferentes espectros; quadrado amarelo: picos com variações entre espectros na região entre 1400 a 1800cm⁻¹).

ApExt = Ponto apical externo; ApInt = Ponto apical interno; CerExt_a = Ponto cervical externo a/ CerExt_b = Ponto cervical externo b; CerInt_a = Ponto cervical interno a; CerInt_b = Ponto cervical interno b. Os números que acompanham as siglas correspondem ao número ordinal referente à ordem que as amostras foram submetidas ao FTIR-ATR.

Foram geradas as PCs (Componentes Principais) a partir da extensa gama de dados numéricos obtidos das espectroscopias, reduzindo a dimensionalidade de dados, preservando o máximo de informações possível e utilizando-se a covariância. A partir das PCs, foram gerados os gráficos das PCAs para observação de separação ou não de grupos, separando-os em: Controle Externo, Controle Interno, Diabético Externo e Diabético Interno.

Apesar da tendência de separação do grupo Diabético Externo em algumas comparações geradas, em particular nas que envolvem a PC1, não é possível afirmar definitivamente que existe uma separação concreta entre os grupos a partir da PCA, já que não houve separação de um grupo em todos os gráficos de dispersão.

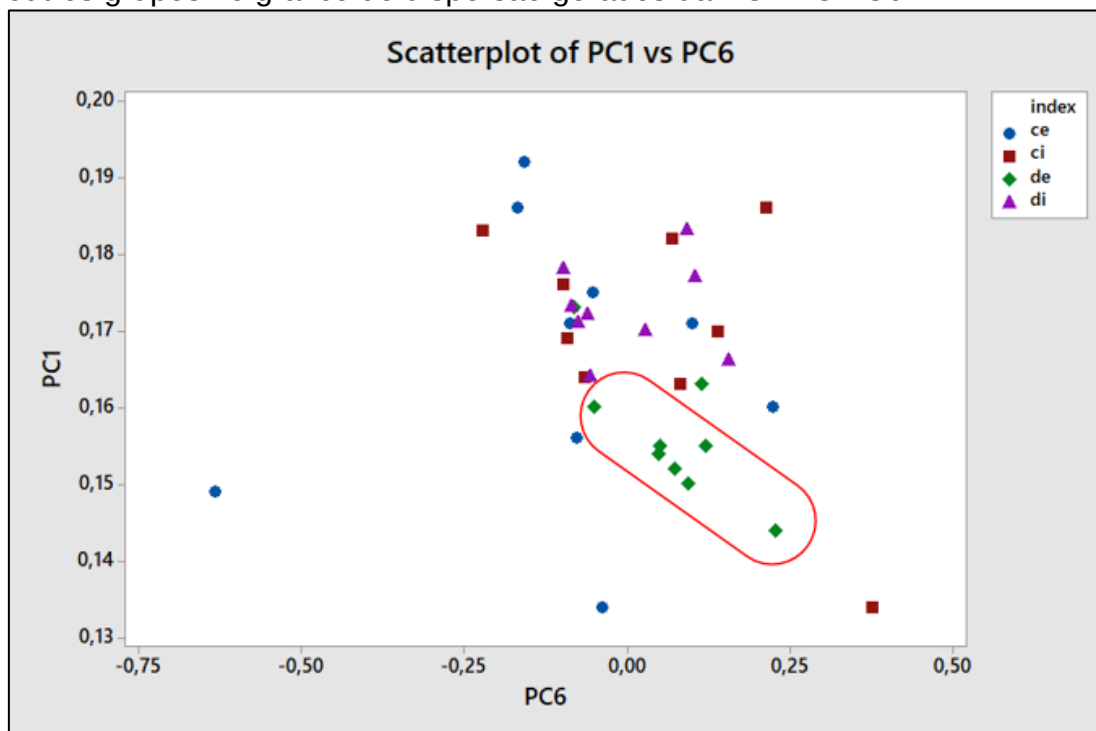
Figura 6 - Gráficos de dispersão gerados a partir da PCA



Legenda:

Os gráficos mostram a dispersão dos grupos: círculo azul – controle externo (ce); quadrado vermelho – controle interno (ci); losango verde – diabético externo (de); triângulo roxo – diabético interno (di).

Figura 7 - Tendência de separação do grupo diabético externo em relação aos outros grupos no gráfico de dispersão gerados da PC 1 vs PC6.



Legenda:

Grupos:

Círculo azul – controle externo (ce);

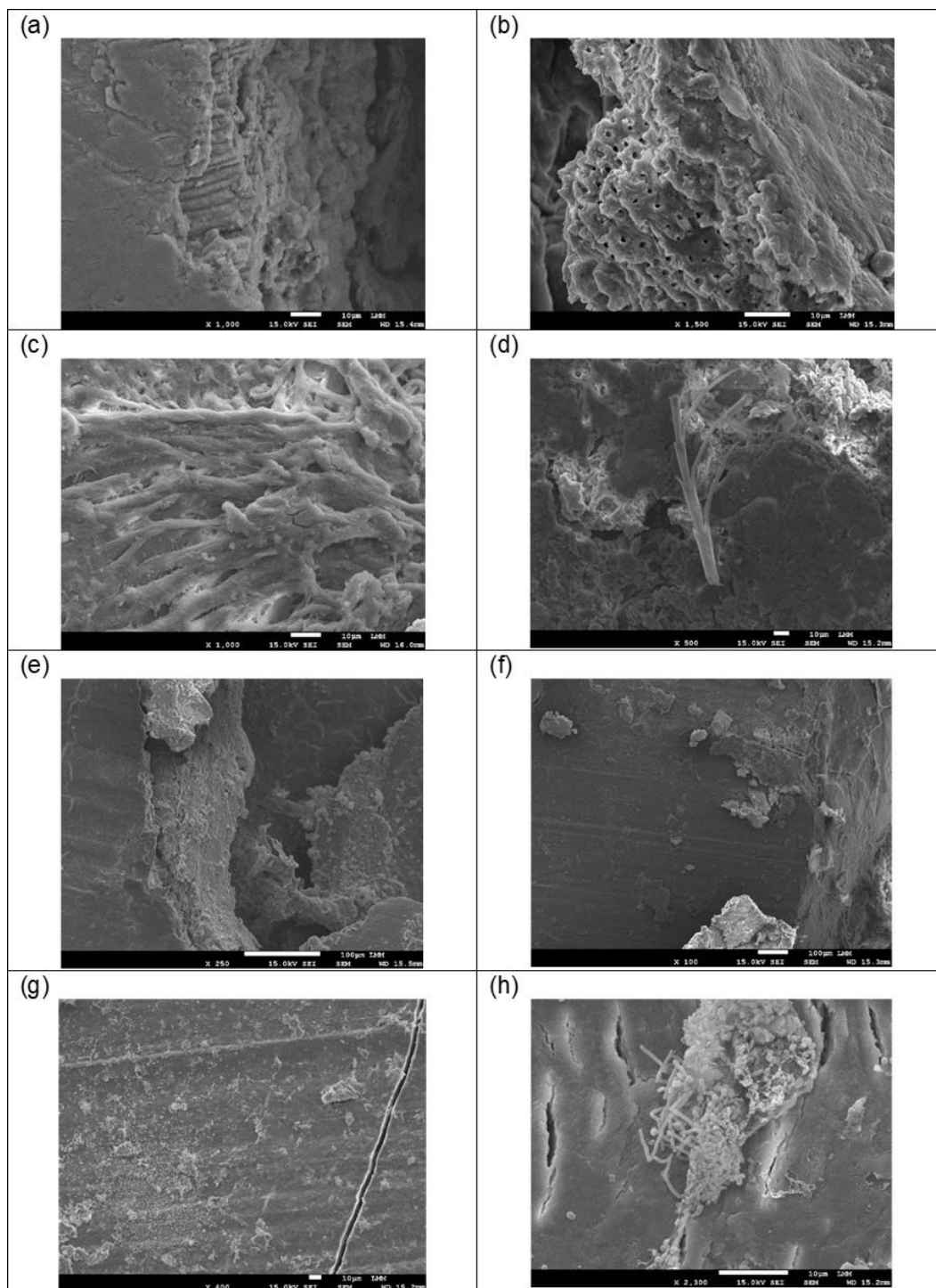
Quadrado vermelho – controle interno (ci);

Losango verde – diabético externo (de);

Triângulo roxo – diabético interno (di).

Além da análise quantitativa feita por meio da PCA, as amostras também foram analisadas qualitativamente em MEV. A figura 8 (a-h) traz as imagens obtidas das amostras dentárias que haviam sido submetidas anteriormente ao FTIR-ATR. Nela, apesar da fixação tardia, prejudicando a preservação da amostra, foi possível observar em alguns pontos os túbulos dentinários formados pelas fibrilas colágenas, os remanescentes de ligamento periodontal e microrganismos. Na figura 9 (a-d) são mostradas imagens de MEV obtidas de outras duas amostras dentárias de doadores com DM tipo 2 e que não foram submetidas ao FTIR-ATR, preservando-se melhor as estruturas a serem visualizadas.

Figura 8 - Imagens obtidas por meio de MEV para caracterização e análise qualitativa das amostras



Legenda:

(a) e (b) – túbulos dentinários entre a dentina e o canal radicular de amostra de diabético, na face interna da lâmina, correspondentes aos picos mostrados do doador 4.

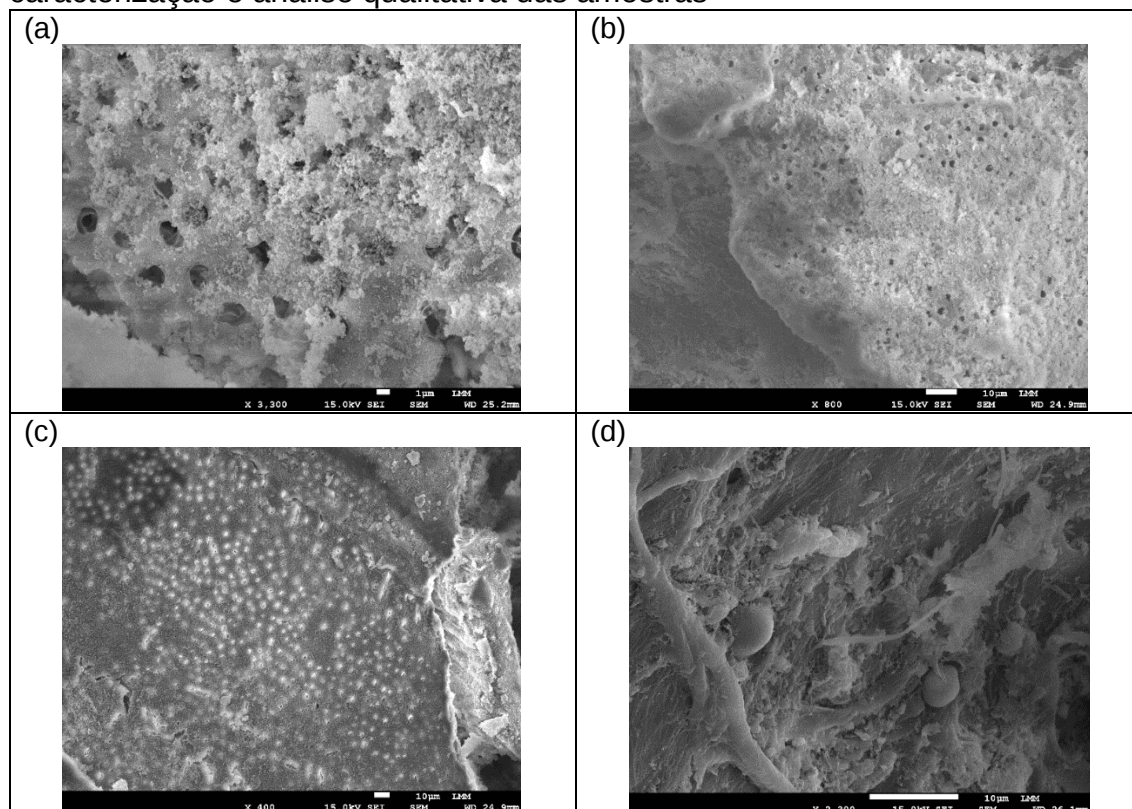
(c) e (d) – remanescentes de fibras do ligamento periodontal de amostras de diabéticos, na face externa da amostra dentária e na região das bordas do dente, correspondente aos doadores 5 e 6, respectivamente,

(e) camada de fibras colágenas remanescentes entre dentina e canal radicular, na face de amostra controle, correspondente ao doador 1.

(f) região apical, com remanescentes de fibras colágenas, ligamento periodontal, e materiais oriundos do corte do preparo, face externa de amostra controle, doador 2.

(g) e (h) microrganismos – cocos, bacilos, organismos filamentosos vistos em maior aproximação na imagem h - em face externa de amostra controle, do doador 3.

Figura 9 - Imagens obtidas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura para caracterização e análise qualitativa das amostras



Legenda:

(a) e (b) túbulos dentinários de amostra de diabético, entre as regiões de dentina e polpa, com diferentes aproximações (x3300 e x800, respectivamente);

(c) visualização de túbulos dentinários perto da região pulpar de amostra de diabético, com pontos brilhantes na entrada dos túbulos devido a um erro no processo de metalização das amostras;

(d) restante de fibras colágenas e células de dente de diabético.

DISCUSSÃO

Esse estudo objetivou analisar a dentina radicular de pessoas com DM tipo 2, comparadas com controles normoglicêmicos, e observar se há formação de *crosslinks* anormais nessa estrutura. A variação entre os picos de diferentes espectros foi maior nas regiões correspondentes à presença de amidas, carbonato, fosfato e conteúdo orgânico, havendo uma tendência de separação

do grupo diabético externo, sugerindo alguma alteração na composição química do tecido dentário nessa condição, provavelmente decorrente da hiperglicemia do ambiente bucal. Portanto, não é descartada a hipótese que o estado de hiperglicemia sistêmica e/ou associada ao aumento da glicose salivar pode levar ao aumento das reações de glicação e consequente formação de *crosslinks* anormais derivados do acúmulo de AGEs na dentina.

É esperado que a quantidade de AGEs aumente com o envelhecimento e níveis elevados de glicose sanguínea, como na DM²². Estudos indicam que, em pessoas vivendo com DM tipo 1, há um aumento de AGEs, como os produtos Amadori, e maior concentração de colágeno na pele. Isso estaria associado a níveis elevados de HbA1c. Com a melhora no controle glicêmico, observa-se redução na glicação do colágeno^{23,24}. Dessa forma, o colágeno em diabéticos apresenta maior número de *crosslinks*, menor solubilidade e digestibilidade, o que contribui para o aumento da rigidez tecidual e está relacionado as complicações da doença¹⁶⁻¹⁸. Além disso, a literatura sugere uma possível associação entre a glicação de proteínas e a progressão da cárie, devido à formação de *crosslinks* anormais no colágeno dentinário. A dentina exposta à cavidade oral entraria em contato com açúcares da dieta, que, por sua vez, ao reagirem com os componentes da matriz dentinária, poderiam realizar glicações ao redor dos túbulos dentinários, afetando o colágeno presente na estrutura²⁵⁻²⁷. O estudo de Fukushima et al. confirmou que os produtos de glicação se acumulam ao redor dos túbulos, sendo mais evidentes na dentina cariada do que na dentina hígida²⁸.

O FTIR-ATR, método escolhido para avaliar as amostras dentárias, é capaz de identificar modificações com relação à estrutura molecular e composição por meio da radiação infravermelha que é refletida na superfície da amostra em contato com o cristal (ATR). Porém, para que uma alteração seja identificada por meio de um pico no espectro gerado, é preciso que haja uma modificação expressiva, em maior escala, a ponto de ser refletida na espectroscopia. Isso pode justificar a não diferença encontrada entre os grupos do nosso estudo. Porém, nos nossos resultados pode ser observado

qualitativamente nos espectros gerados uma variação entre picos de determinadas regiões, levando à hipótese de que possam estar relacionados aos *crosslinks* derivados dos AGEs. Na região que mais apresentou diferença entre os vários espectros, entre os comprimentos de onda de 600 a 800cm⁻¹, são encontrados fosfato e hidroxila, enquanto entre a região de 1400 a 1800cm⁻¹, há presença de amidas 1 e 2, carbonato, água e matéria orgânica^{29, 30}.

Em trabalhos prévios, observou-se uma diminuição na intensidade do pico na região aproximada de 1400cm⁻¹ ao reagir polifenóis com dentina, o que poderia sugerir formação de *crosslinks* nessa região, ou seja, uma provável reticulação artificial do colágeno. Também se observou que a redução no pico de amida 2 e o aumento no pico de amida 1 poderiam estar associados a formação de *crosslinks*³¹⁻³³. Entre os grupos do nosso experimento, a maior diferença observada qualitativamente na região onde há a presença de amidas foi no doador 2, pertencente ao grupo controle, e não ao grupo diabético como esperado. Porém, por meio do PCA, método utilizado, observou-se a tendência de separação do grupo diabético externo (isto é, faces externas das amostras dentárias dos doadores com DM tipo 2). Esse achado pode sugerir que a provável causa para maior acúmulo de AGEs e consequente formação de *crosslinks* anormais seja decorrente de uma hiperglicemia local, por meio do contato dessas superfícies com a saliva presente no meio bucal. Isso pode ser confirmado com os estudos prévios que demonstraram que a saliva de DM é alterada e possui maior quantidade de glicose^{4,5}.

Estudos recentes corroboram com nossa hipótese de que a glicação do colágeno em DM pode estar associada a mecanismos que favorecem a progressão da doença cárie no tecido dentinário. AGEs derivados da glicose promovem também adesão inicial, formação de biofilme e produção de polissacarídeo extracelular insolúvel de *S. mutans*³⁴. Mudanças no comportamento da adesão e formação de biofilme oral como função da glicação do colágeno pode ajudar a explicar o aumento da disbiose em pacientes com DM, desempenhando assim, um potencial fator envolvido na patogênese da doença cárie nesses pacientes^{11,34}.

É relevante discutir variáveis que podem influenciar nossos resultados e a formação de AGEs e *crosslinks* anormais na estrutura dentinária. No grupo diabético, os doadores relataram diagnóstico de diabetes, mas apresentavam HbA1c abaixo de 6,5%, valor de referência para determinar o controle glicêmico. Assim, é fundamental considerar o controle realizado pelos doadores e sua duração, para compreender o período em que o paciente esteve em hiperglicemia. Além disso, futuros estudos podem investigar a separação por subgrupos etários, dado que o envelhecimento do colágeno ocorre também em idosos, podendo ser um fator de confusão na análise de *crosslinks* em pacientes diabéticos. É fundamental compreender que avaliar o período de exposição à saliva hiperglicêmica, o tempo de diagnóstico de DM e o tempo em que o doador se encontra com a glicose descompensada se fazem necessários para futuras análises.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Como citado anteriormente, os doadores do grupo DM tiveram HbA1c controlada, porque não poderiam fazer a cirurgia com a hiperglicemia aumentada por risco de infecção. Apesar de haver uma diferença entre os grupos quanto aos diagnósticos recebidos pelos doadores (grupos normoglicêmico e diabético), o controle da doença era realizado com o médico e relatado pelos doadores durante a entrevista de recrutamento. Como as extrações das amostras dentárias tinham indicação em decorrência de doenças como lesões de cárie e periodontite em estágios avançados, é possível que a composição química das amostras tenha sido afetada, uma vez que esses processos patológicos modificam significativamente a composição do tecido dentário. No entanto, tais características não foram registradas individualmente para os dentes avaliados, visto que todos apresentavam indicação de extração. Ressalta-se, entretanto, que essa condição era semelhante para todos os dentes incluídos (visto da não diferenciação clara dos grupos), o que sugere que a limitação foi minimizada. Por tratar-se de um estudo piloto, não é possível concluir que as alterações observadas sejam efetivamente *crosslinks*; estudos adicionais, com maior número amostral e controle das condições clínicas, são necessários para

confirmar o potencial envolvimento da formação de AGEs no contexto do DM. Consideramos que seria interessante realização de novos estudos a partir de extração de terceiros molares hígidos. Futuramente, também pretende-se investigar alterações em amostras de DM tipo 1, para fins de comparação.

CONCLUSÃO

Sugere-se que há alguma alteração na composição química do tecido dentário na região externa cervical em DM, provavelmente decorrente da hiperglicemia local. Porém, apesar de alguns picos estarem alterados, não foi possível concluir que há a formação de *crosslinks* anormais, pois o padrão de espectrometria não diferenciou claramente as amostras controles e diabéticas por não haver separação de grupos em todos os gráficos de dispersão.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Iniciação Científica EBSEH/HUB. Essa pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (Ebserh) (n. 408020/2021-0).

REFERÊNCIAS

1. Services UDoHaH. Global health and aging. World Health Organization. 2011.
2. Magliano DJ, Boyko EJ. IDF diabetes atlas. 2022.
3. McKay TB, Priyadarsini S, Karamichos D. Mechanisms of collagen crosslinking in diabetes and keratoconus. *Cells*. 2019;8(10):1239.
4. Almeida AK, Guimarães MdCM, Grisi DC, Damé-Teixeira N. Doença cárie em portadores de diabetes mellitus: uma revisão narrativa da literatura. *Oral Sciences*. 2017;18-23.
5. Goodson JM, Hartman M-L, Shi P, Hasturk H, Yaskell T, Vargas J, et al. The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. *PloS one*. 2017;12(3):e0170437.

6. Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21-31.
7. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):76-89.
8. Sanz M, Ceriello A, Buysschaert M, et al. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2018;45(2):138-49.
9. Nascimento GG, Leite FRM, Vestergaard P, Scheutz F, López R. Does diabetes increase the risk of periodontitis? A systematic review and meta-regression analysis of longitudinal prospective studies. *Acta Diabetol*. 2018;55(7):653-67.
10. Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M. Specificities of caries on root surface. Root caries: From prevalence to therapy. 26: Karger Publishers; 2017. p. 15-25.
11. de Lima AKA, Amorim dos Santos J, Stefani CM, Almeida de Lima Ad, Damé-Teixeira N. Diabetes mellitus and poor glycemic control increase the occurrence of coronal and root caries: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*. 2020;24:3801-12.
12. Marques RCR, da Silva JR, Lima CPV, Stefani CM, Dame-Teixeira N. Salivary parameters of adults with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2022;134(2):176-89.
13. Lima CPV, Chagas LFA, Marques RCR, Grisi DC, Salles LP, Guimarães MdCM, et al. Can hyperglycemia be associated with caries activity and root caries in adults? *Primary Care Diabetes*. 2023;17(1):48-54.
14. Greis F, Reckert A, Fischer K, Ritz-Timme S. Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation? *International journal of legal medicine*. 2018;132:799-805.
15. Eble AS, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glucosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(15):9406-12.
16. Hamlin CR, Kohn RR, Luschin JH. Apparent accelerated aging of human collagen in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1975;24(10):902-4.
17. Schnider SL, Kohn R. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *The Journal of clinical investigation*. 1981;67(6):1630-5.
18. Kohn R. Effects of age and diabetes mellitus on cyanogen bromide digestion of human dura mater collagen. *Connective tissue research*. 1983;11(2-3):169-73.
19. Riordain RN, Glick M, Al Mashhadani SSA, Aravamudhan K, Barrow J, Cole D, et al. Developing a standard set of patient-centred outcomes for adult oral health—an international, cross-disciplinary consensus. *international dental journal*. 2021;71(1):40-52.
20. Harman NL, Wilding JP, Curry D, Harris J, Logue J, Pemberton RJ, et al. Selecting Core Outcomes for Randomised Effectiveness trials In Type 2 diabetes (SCORE-IT): a patient and healthcare professional consensus on a core outcome set for type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care*. 2019;7(1):e000700.

21. Alves A, Silva B, Costa D, et al. Macronutrient consumption in adults and association with oral and systemic parameters: A cross-sectional study. *Arch Oral Biol*. 2025;174:106241.
22. Matsuda Y, Miura J, Shimizu M, Aoki T, Kubo M, Fukushima S, et al. Influence of nonenzymatic glycation in dentinal collagen on dental caries. *Journal of Dental Research*. 2016;95(13):1528-34.
23. Vishwanath V, Frank KE, Elmetts CA, Dauchot PJ, Monnier VM. Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus: correlation with long-term complications. *Diabetes*. 1986;35(8):916-21.
24. Lyons TJ, Bailie KE, Dyer DG, Dunn JA, Baynes JW. Decrease in skin collagen glycation with improved glycemic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87(6):1910-5.
25. Shellis R. Effects of a supersaturated pulpal fluid on the formation of caries-like lesions on the roots of human teeth. *Caries research*. 1994;28(1):14-20.
26. Arnold W, Konopka S, Gaengler P. Qualitative and quantitative assessment of intratubular dentin formation in human natural carious lesions. *Calcified tissue international*. 2001;69(5).
27. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1996;7(2):104-33.
28. Fukushima S, Shimizu M, Miura J, Matsuda Y, Kubo M, Hashimoto M, et al. Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin. *Biomedical optics express*. 2015;6(5):1844-56.
29. Lopes CdCA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2018;53(9):747-69.
30. Bachmann L, Diebold R, Hibst R, Zetzl DM. Infrared absorption bands of enamel and dentin tissues from human and bovine teeth. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2003;38(1):1-14.
31. Wang Y, Green A, Yao X, Liu H, Nisar S, Gorski JP, et al. Cranberry juice extract rapidly protects demineralized dentin against digestion and inhibits its gelatinolytic activity. *Materials*. 2021;14(13):3637.
32. Liu Y, Chen M, Yao X, Xu C, Zhang Y, Wang Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. *Dental Materials*. 2013;29(4):485-92.
33. Miles CA, Avery NC, Rodin VV, Bailey AJ. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. *Journal of molecular biology*. 2005;346(2):551-6.
34. Schuh C, Benso B, Naulin P, Barrera N, Bozec L, Aguayo S. Modulatory effect of glycated collagen on oral streptococcal nano-adhesion. *Journal of Dental Research*. 2021;100(1):82-9.