



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Brenda Lisseth Pineda Mancía

Efeitos da radiação ionizante na composição química e propriedades mecânicas da dentina de ratos diabéticos.

Effect of ionizing irradiation on the chemical composition and mechanical properties of the diabetic rat's dentin

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia na Área de
Clínica Odontológica Integrada

Uberlândia, 2019

Brenda Lisseth Pineda Mancia

Efeitos da radiação ionizante na composição química e propriedades mecânicas da dentina de ratos diabéticos

Effect of ionizing irradiation on the chemical composition and mechanical properties of the diabetic rat's dentin

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia na Área de
Clínica Odontológica Integrada

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana Resende Novais Simamoto

Co-orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Veridiana Resende Novais Simamoto

Prof. Dr. Paulo César Freitas Santos Filho

Profa. Dra. Linda Wang

Uberlândia, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P649e Pineda Mancia, Brenda Lisseth, 1986
2019 Efeitos da radiação ionizante na composição química e propriedades mecânicas da dentina de ratos diabéticos = Effect of ionizing irradiation on the chemical composition and mechanical properties of the diabetic rat's dentin [recurso eletrônico] / Brenda Lisseth Pineda Mancia. - 2019.

Orientadora: Veridiana Resende Novais.
Coorientador: Robinson Sabino da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1233>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Odontologia. 2. Diabetes. 3. Dentina. 4. Radiação ionizante. I. Novais, Veridiana Resende, 1979, (Orient.). II. Silva, Robinson Sabino da, 1981, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.ppgoufu.com - copod@umarama.ufu.br



Ata

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado COPOD

Data: 22/02/2019

Discente: **Brenda Lisseth Pineda Mancía (11712ODO002)**

Título do Trabalho: Efeitos da radiação ionizante na composição química e propriedades mecânicas da dentina de ratos diabéticos

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Propriedades físicas e biológicas dos materiais odontológicos e das estruturas dentais

Projeto de Pesquisa de vinculação: Propriedades físicas e biológicas dos materiais odontológicos e das estruturas dentais

As **oito horas e trinta minutos** do dia **vinte e dois de fevereiro de 2019** no Sala de Reuniões Bloco 4L Anexo B, sala 31 Campus Umarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em dezembro de 2018, assim composta: Professores Doutores: Paulo César Freitas Santos-Filho (UFU); Linda Wang (FOB/USP); e o orientador(a) do(a) candidato(a): **Veridiana Resende Novais Simamoto**.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dra. Veridiana Resende Novais Simamoto apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de argüição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores (as), que passaram a argüir o(a) candidato(a). Finalizada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o(a) candidato(a) (A)provado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada eletronicamente pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana Resende Novais, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/02/2019, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo César de Freitas Santos Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/02/2019, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Linda Wang, Usuário Externo**, em 22/02/2019, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código Assinatura verificador **1043633** e o código CRC **4A9F84AB**.

DEDICATORIA

A Deus:

A quem entrego todas minhas alegrias e tristezas. Agradeço o dom da vida e as oportunidades que me proporcionou pra chegar ate aqui. Obrigada Deus principalmente pela sabedoria, força e coragem que me deu de largar tudo e correr e ir à busca de meus sonhos e por me fortalecer ate a realização desta conquista.

A Medalha Milagrosa

A Virgem Maria intercedeu por min por meio da medalha milagrosa, eu usei com fé e devoção e recebi graças especiais, uma delas foi meu mestrado.

A Meus Pais:

Com os senhores aprendi a confiar em Deus e lutar pela conquista de meus planos.

Aprendi a rezar em família para sempre estarmos juntos e mesmo que muitos quilômetros separam a gente, eu sempre sinto a família do meu lado. Agradeço seu amor incondicional, esforço e dedicação para ter uma família unida e com valores. Sem os senhores eu não teria chegado ate onde hoje eu estou. Pai, obrigada por me ensinar a ser corajosa, por acreditar em min e me ensinar que tudo o que eu sono eu sou capaz de cumprir, o senhor é meu melhor exemplo de superação. Mae, obrigada por estar sempre do meu lado e sempre me escutar, por me ensinar a ser independente e por acreditar em min; algum dia eu serei como à senhora. A distancia não nos separa porque o amor mantém a gente unidos.

A Meus Irmãos:

Vocês são os melhores presentes que Deus e meus pais me deram nesta vida. Toda uma vida do lado de vocês foi o melhor que poderia ter me acontecido. Joel: obrigada por sempre cuidar de min e me fazer sentir protegida. Julian: obrigada por sempre ser meu companheiro e me ensinar a ser mais calma. Alex: obrigada por sempre me escutar e me aconselhar na hora de tomar decisões. Yariel: obrigada pela cumplicidade, por acreditar em min e me lembrar de que eu sou capaz de fazer as coisas. Eu não posso comparar o amor de vocês com qualquer outro amor, são as pessoas que eu senti mais falta nestes dois anos, obrigada por sempre torcer por min e por fazer de min uma melhor pessoa.

Amor jamais vai faltar.

Agradecimentos

A minha orientadora: Veridiana Resende Novais Simamoto.

Veri, Deus deu para você o dom de ensinar de um jeito diferente, com muita paciência, disposição, exigência da perfeição e amor pelas coisas que faz. Obrigada por todos os ensinamentos, tanto profissionais, como pessoais e ser além de uma orientadora, uma amiga. Agradeço a Deus por ter você como orientadora. A você, minha gratidão e admiração.

Aos meus co-orientadores:

Prof. Robinson Sabino da Silva: Obrigada pela partilha de conhecimentos e pela dedicação ao nosso trabalho.

Doutoranda: Camila Lopes: Quando a vida nos apresenta pessoas tão dedicadas e responsáveis como você eu só posso sentir admiração. Eu sei que você dedicou muito de seu tempo pra me ensinar e estou muito agradecida porque além de dedicar seu tempo para me ensinar também, tudo o que fez foi com boa disposição e carinho. Muito obrigada.

A Minha família:

Pais, irmãos, avós, primos, tios e amigos salvadorenhos que mesmo estando longe, sempre me acompanharam com suas orações e torcendo por mim. Agradeço especialmente a minha família Brasileira: Tia Tefy, Padrinho Manuel, Gaby e Ingrid porque sempre estiveram me acompanhando em todo momento e dando os melhores conselhos. Obrigada pelos momentos compartilhados, pelas conversas e por sempre se preocuparem comigo.

A Meu grupo de Pesquisa:

Rafael, Renata, Laura, Camila, Alessandro e Thiago: que bom que Veri ensinou a nosso grupo que trabalhando em equipe o trabalho é muito melhor. Obrigada por me acolher tão bem, pelas conversas, pela paciência e partilha de momentos especiais que levo no meu coração. Agradeço a Deus ter vocês como colegas de trabalho e amigos.

A Minhas amigas:

Laura: com você aprendi a acreditar que no final tudo da certo, obrigada por me fazer sentir com mais segurança em tudo o que eu faço.

Marcela: seus conselhos são ótimos, obrigada pelas conversas intermináveis, por sempre se preocupar por meu bem estar.

Bia: compartilhar tantos momentos com você foi muito especial e inesquecível, obrigada pela partilha.

Thais: quando te conheci eu acreditei na sua espontaneidade sincera. Obrigada pelas conversas e momentos que compartilhamos juntas.

Meninas vocês são maravilhosas, nestes dois anos foram às pessoas que ofereceram sua amizade sem limites. Agradeço a Deus ter vocês na minha vida.

Aos meus irmãos estrangeiros no Brasil:

Erick: desde o dia que eu soube que ganhei a bolsa você me acompanhou e ajudou em tudo e se preocupou por mim, agradeço demais pelos momentos que compartilhamos juntos, sinto muito sua falta.

Luis: morar com você foi ótimo, obrigado por me acompanhar e não me deixar sentir sozinha, eu nunca vou esquecer essas conversas todos os dias e os momentos que compartilhamos.

David: quando te conheci eu senti que você tem um grande coração, é bom saber que eu tenho alguém pra me escutar quando eu chegar em casa.

Meninos, eu considero vocês meus irmãos porque sempre estiveram comigo e me ajudaram a não sentir tanta falta de meus irmãos, sua amizade sincera e o compartilhamento de tantos momentos juntos foram legais. Continuem lutando pelos seus sonhos. Agradeço a Deus ter vocês como minha família aqui em Uberlândia.

A meu namorado:

O verdadeiro amor é manifestado nos momentos de dificuldade e a etapa final do mestrado foi a mais difícil e estressante porém eu sempre tive um companheiro que fez meus dias mais fáceis, com compreensão, paciência e amor. Obrigada por me fazer sentir segura, protegida, amada e respeitada. Amo você!

Aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU) e da Escola Técnica de Saúde ESTES pela amizade, dedicação e ensinamentos transmitidos; agradeço especialmente a:

Profa. Morgana Ghilherme por acreditar em min e abrir as portas da Escola Técnica ESTES e do projeto de extensão. Estou imensamente agradecida por me dar essa grande oportunidade, você foi uma das professoras com quem eu mais aprendi nestes dois anos, seus ensinamentos não tem limites. Obrigada também pela amizade especial e pelos ensinamentos para a vida. Você se tornou uma das minhas inspirações.

Prof. Alfredo Fernandes, é uma honra ter o senhor como professor e amigo, obrigada por compartilhar seus conhecimentos e pelos conselhos. Sinto muita admiração pelo senhor.

Prof. Paulo Simamoto, chegar ao Brasil e saber que alguém esta te esperando é muito legal e gera confiança. Obrigada pela parceria e ensinamentos.

Prof. Carlos Soares, fiz cada uma das disciplinas coordenadas pelo senhor só pra ter a honra de aprender seus ensinamentos, obrigada por me fazer sentir acolhida no programa de pós graduação.

Aos professores da banca de qualificação, Prof. Carlos José Soares, Prof. Guilherme de Oliveira, Profa. Paula Dechichi, e os professores da banca de defesa: Prof. Paulo Cesar Freitas e professora Linda Wang, muito obrigada pelas considerações e contribuições que fizeram para o meu trabalho. Obrigada pelo aprendizado e pela amizade.

Aos amigos da turma do mestrado, pela convivência, solidariedade, compreensão, ensinamentos, e pelos momentos que passamos juntos, que se tornarão saudosas lembranças. Desejo a cada um de vocês muito sucesso, sempre levarei vocês no meu coração!

Aos técnicos do Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular (CPBio), Bruno, Jonh Douglas e Eliete, obrigada pela amizade, disposição diariamente no laboratório e pela ajuda na execução do trabalho.

Aos funcionários da FOUFU, em especial à Brenda, Graça, e seu Advaldo, muito obrigado pela amizade e pela ajuda sempre que precisei em todos os momentos sempre muito solícitos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (PPGO–UFU), pela oportunidade de cursar uma pós-graduação stricto sensu de excelente qualidade.

Ao pessoal do Programa de Cuidados Específicos a Doenças Estomatológicas (PROCEDE), obrigada por todo o apoio e suporte, esta experiência somou muito à minha formação pessoal e profissional.

Ao Departamento de Oncologia Clínica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), MG, à Faculdade da Engenharia Mecânica e de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, e ao Centro de Pesquisa Odontológica Biomecânica, Biomaterial e Biologia Celular (CPBIO).

A Organização dos Estados Americanos (OEA), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

A todos que torceram por mim e que contribuíram, direta ou indiretamente, e os que me acompanharam por meio de orações nesta caminhada. Muito obrigada! Deus abençoe a cada um de vocês.

“Não tenha medo de coisa alguma, ou de nada.

Não tenha medo das fraquezas humanas,
nem dos mistérios de Deus.”

JOÃO PAULO II

SUMÁRIO	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO/PALAVRAS-CHAVE	11
ABSTRACT/KEYWORDS	13
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	15
2. CAPÍTULO - ARTIGO 1	18
REFERÊNCIAS	35
ANEXO	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ND – Non diabetic

D - Diabetic

NI - Non-irradiated

I – Irradiated

FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

EDS - X-ray Energy-Dispersive Spectroscopy

KHN- Knoop hardness

T1DM - Type 1 Diabetes Mellitus

RT - Radiotherapy

HNC - Head and Neck Cancer

DM1 – Diabetes Mellitus Tipo 1

RESUMO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da irradiação utilizada para radioterapia nas propriedades químicas e mecânicas da dentina de ratos diabéticos. Incisivos de ratos não diabéticos (ND) e diabéticos (D) foram seccionados transversalmente e divididos em 2 grupos de acordo com a irradiação: não irradiado (NI) e irradiado (I) (n = 5). Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) avaliou as razões amida I / fosfato e carbonato / fosfato; proporções amida I / amida III e amida I / CH₂, enquanto a análise da composição atômica foi realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS); e foi feita análise de microdureza Knoop (KHN) para avaliar propriedades mecânicas. Todos os dados foram analisados utilizando-se 2-way ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Com base no FTIR, foi observado um aumento significativo na razão de carbonato / fosfato após a irradiação. Para as razões amida I / fosfato e amida I / amida III não foi encontrada diferença significativa entre os grupos. No entanto, a amida I / CH₂ apresentou menor razão para os grupos diabéticos em comparação com os não diabéticos. O conteúdo de Ca e P dos grupos diabéticos foi menor em comparação com os não diabéticos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as relações Ca / P. Os grupos ND mostraram valores de KHN significativamente mais elevados, independentemente da irradiação. Após a irradiação, a KHN demonstrou valores significativamente menores. Conclui-se que diabetes e a radiação ionizante alteraram a composição química da dentina de ratos, alterando a matriz mineral e orgânica, e reduzindo a microdureza.

Palavras-chave: Análise espectral, Dentina, Diabetes Mellitus, Dureza, Radiação ionizante.

Abstract

ABSTRACT

Objective: Evaluate the effect of irradiation used for radiotherapy in the chemical and mechanical properties of the dentin of diabetic rats. Incisors from non-diabetic (ND) and diabetic (D) rats were sectioned transversally and divided into 2 groups according to irradiation therapy: non-irradiated (NI) and irradiated (I) (n=5). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) evaluated the protein/mineral, carbonate/phosphate ratios; amide I/amide III and amide I/CH₂ ratios, while atomic composition analysis was performed by X-ray Energy-Dispersive Spectroscopy (EDS); and the Knoop hardness (KHN) values was measured of the dentin. All data were analyzed for by using a two-way ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). Based on FTIR, a significant increase in the carbonate/phosphate ratio following irradiation was observed. For amide I/phosphate and amide I/amide III ratios no significant difference was found among groups. However, amide I/CH₂ showed decreased ratio for diabetic groups compared with non-diabetic groups. The Ca and P content of the diabetic groups were lower compared with non-diabetic. No significant differences was found between Ca/P ratios. ND groups showed significantly higher KH values, regardless of irradiation. After radiation, the KHN demonstrated significantly decreasing values. It was verified that diabetes and the ionizing radiation altered the chemical composition of dentin by altering the mineral and the organic matrix of rat's dentin, reducing the microhardness.

Keywords: Dentin, Diabetes, EDS, Fourier transform infrared spectroscopy, Microhardness, Radiotherapy.

Introdução e Referencial teórico

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Câncer e diabetes estão entre os principais problemas de saúde pública do mundo (Taubes et al., 2012; Abbassy et al., 2015). Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é uma condição crônica na qual o pâncreas produz pouca ou nenhuma insulina necessária para o metabolismo da glicose (Abbassy et al., 2015). É um dos distúrbios sistêmicos mais prevalentes que afeta um número crescente de indivíduos globalmente (Abbassy et al., 2015). A incidência de diabetes tipo 1 está aumentando em todo o mundo, mas há enorme variação por país com algumas regiões do mundo tendo maior incidência do que outros (You et al., 2015). Devido ao crescimento e envelhecimento da população, é cada vez mais frequente a ocorrência de pacientes portadores de diabetes mellitus ser diagnosticado também com câncer, pois muitas evidências têm apontado para a associação entre esta comorbidade e o risco ao desenvolvimento de uma neoplasia (Lin et al., 2014). Acredita-se que a diabetes possa influenciar o processo carcinogênico por vários mecanismos, sendo o principal deles a hiperglicemia, que quando não controlada, serve de combustível para o desenvolvimento da neoplasia, pois o tumor, essencialmente, possui alta necessidade de glicose para alimentar sua proliferação e crescimento (Giovannucci et al., 2010; Stot-miler, 2012; Arcidiacono, Iiritano & Nocera, 2012; Collins, 2014; Aune D, Chan DS, Lau R et al., 2012). Outras evidências também sustentam que há uma relação entre o metabolismo anormal de glicose e o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (Stot-miler et al., 2012). Além disso, pacientes diabéticos e oncológicos com tumores na região de cabeça e pescoço estão frequentemente associados a uma menor sobrevida, pior prognóstico e maior taxa de infecção após a ressecção do tumor durante o período pós-operatório (Raikundalia et al., 2016).

A cada dois anos, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) publica uma estimativa para o acometimento de câncer na população brasileira. Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. 1,2 milhão de novos casos de câncer devem surgir no Brasil até 2019 (INCA 2018). Para o Brasil, estimam-se 11.200 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, sendo o 12º mais frequente entre todos os cânceres (INCA 2018).

A radioterapia é utilizada para tratamento desta neoplasia (Belcher et al., 2014) e consiste em empregar uma dose total de radiação entre 60 a 70 Gy no local, sendo muito comum o esquema de fracionamento, com aplicação de 2 Gy diários, 5 dias por semana, durante 5 a 7 semanas (Jham & Freire, 2006; Epstein et al., 2012). Porém, inevitavelmente, este tratamento também envolve exposição aos tecidos sadios adjacentes ao tumor localizados no campo da irradiação, acarretando várias complicações, que podem interferir na qualidade de vida dos pacientes e no andamento

do tratamento (Spetch, 2002; Vissink et al., 2003). As alterações na cavidade bucal mais frequentes são: mucosite, alterações no paladar, infecções oportunistas (candidose, herpes), xerostomia e hipofunção salivar, trismo, osteradionecrose, periodontites, cáries relacionada a radiação, necrose de tecido mole (Jham & Freire, 2006; Kielbassa et al., 2006; Ray-Chaudhuri, Porter & Shah, 2013) e dor neuropática e orofacial (Epstein et al., 2012). Entre essas alterações, a cárie relacionada à radiação é considerada uma das mais preocupantes, pois configura uma forma de cárie com grande potencial destrutivo e rápida progressão, podendo levar à amputação total da coroa e completa perda da dentição (Kielbassa et al., 2006; Deng et al., 2015; Buglione et al., 2016). Possui como etiologia a combinação de efeitos indiretos da radioterapia somados aos efeitos diretos na estrutura dentária (Kielbassa et al., 2006), como alterações na microdureza, composição química e micromorfologia do esmalte e dentina (Lishout & Bots, 2014; Deng et al., 2015; Qing et al., 2016), predispondo a dentição a uma maior ocorrência deste tipo de lesão.

A intensidade e a ocorrência das reações adversas decorrentes da radioterapia podem depender, dentre vários fatores, das condições clínicas do paciente (Jham & Freire, 2006; Caccelli & Raport 2008). Portanto, é razoável imaginar que o paciente diabético pode responder diferentemente quando comparados a pacientes sem essa comorbidade. Alguns estudos demonstram maior suscetibilidade à cárie em diabéticos (Hegde et al., 2014), pois as mudanças metabólicas associadas a essa comorbidade podem levar a alterações na composição mineral dos dentes além de promover o início e progressão da lesão cáriosa (Gutowska et al., 2011). Recentes estudos têm relatado efeitos prejudiciais da diabetes associados ao elevado nível de glicose no sangue, como alterações na formação de esmalte e dentina através do efeito inibitório na atividade de odontoblastos e ameloblastos (Abbassy et al., 2015) e também interferências na maturação e mineralização da matriz colágena da dentina (Valikangas et al., 2001).

Sendo assim, dentro do conhecimento dos autores, ainda não existem relatos suficientes disponíveis na literatura abordando especificamente sobre os efeitos adversos da radioterapia na cavidade bucal em pacientes diabéticos. Tendo em vista a maior suscetibilidade a agravos em saúde bucal já bem estabelecida na literatura, torna-se relevante avaliar se a radioterapia associada a esse comprometimento sistêmico pode estar relacionada a uma maior severidade dos efeitos adversos na cavidade oral ou provocar maior dano às estruturas dentais. Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa é analisar o efeito da doença diabetes e da radiação ionizante por meio do acelerador linear nas propriedades químicas e mecânicas em dentina de ratos.

Capítulo

2. Capítulo 1

Artigo 1

Effect of the ionizing radiation in the head and neck on the chemical composition and mechanical properties of the diabetic rat's dentin

Brenda Lisseth Pineda Mancia,¹ Camila de Carvalho Almança Lopes¹, Robinson Sabino-Silva¹, Veridiana Resende Novais.¹

¹Department of Operative Dentistry and Dental Materials, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Avenida Pará s/n°, Campus Umuarama, Bloco 4L, Bairro Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais 38400-902, Brazil.

***Artigo a ser enviado para o periódico Clinical Oral Investigations**

Correspondence:

Veridiana Resende Novais, Avenida Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo A, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil. Tel: +55-34-3218-2222. e-mail: veridianaresende@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: Evaluate the effect of irradiation used for radiotherapy in the chemical and mechanical properties of the dentin of the diabetic rats.

Materials and methods: incisors from non-diabetic (ND) and diabetic (D) rats were sectioned transversally and divided into 2 groups according to irradiation therapy: non-irradiated (NI) and irradiated (I) (n=5). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) evaluated the protein/mineral and carbonate/phosphate ratios; amide I/amide III and amide I/CH₂ ratios, while atomic composition analysis was performed by X-ray Energy-Dispersive Spectroscopy (EDS); and the Knoop hardness (KHN) values was measured of the dentin. All data were analyzed by using a two-way ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

Results: Based on FTIR, a significant increase in the carbonate/phosphate ratio following irradiation was observed. For amide I/phosphate and amide I/amide III ratios no significant difference was found among groups. However, amide I/CH₂ showed decreased ratio for diabetic groups compared with non-diabetic groups with significant difference. The Ca and P content of the diabetic groups showed significantly were lower compared with non-diabetic. No significant differences was found between Ca/P ratios. ND groups showed significantly higher KH values regardless of irradiation. After radiation, the KHN demonstrated significantly decreasing values.

Conclusion: Diabetes and the radiotherapy altered the chemical composition of dentin by altering the mineral and the organic matrix of rat's dentin, reducing the microhardness.

Clinical relevance: The destructive potential of radiation in the head and neck region added to diabetes mellitus may cause adverse consequences to oral hard tissues and oral function.

Keywords: Dentin, Diabetes, EDS, Fourier transform infrared spectroscopy, Microhardness, Ionizing radiation.

Introduction

Each year, there is an estimated 416.05 new cases of cancer per 100.000 inhabitants, where in the head and neck cancer represents approximately 13.6%, ranking seventh in the world, with an estimated annual incidence of 640,000 case [1]. Radiotherapy (RT) is considered the main treatment for patients with HNC, sometimes combined with surgery or [2]. According to the World Health Organization, two-thirds of oncological patients will receive the radiotherapy as a treatment option [3].

Radiotherapy is one of the common oral cancer therapies, which may affect dental and oral health [4]; including mucositis, hyposalivation, osteoradionecrosis, dentition breakdown, and radiation-related caries [5]. It was previously described that radiation-induced hyposalivation could be the main cause of radiation-related caries development [6]. However, recent investigations have also suggested that radiation has direct effects in disorganization of the dentin structure with loss of mineral-organic interaction [7, 8, 9].

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) is a chronic condition in which the pancreas produces little or no insulin necessary for glucose metabolism [10]. It is one of the most prevalent systemic disorders affecting an increasing number of individuals globally [10]. This disease exhibits various detrimental alterations on bones, and mineral metabolism [11, 12]. Diabetes is also associated to oral complications such as xerostomia, tooth loss, gingivitis, periodontitis, and oral mucosa lesions [11]. The glucose has a direct effect on odontoblasts and pulp tissue cells, and it is suggested that this effect cannot be compensated with the addition of insulin [13].

The radiotherapy treatment in patients diagnosed with head and neck cancer, as well as the patient with diabetes, may have a compromised oral health. From this, the clinical questioning is generated: will the association of these two conditions increase the oral complications? Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of radiation and the induced diabetes in chemical and mechanical properties of rat's dentin. The null hypothesis was that the radiotherapy would have no effect on the dentin's properties of diabetes rats.

Material and methods

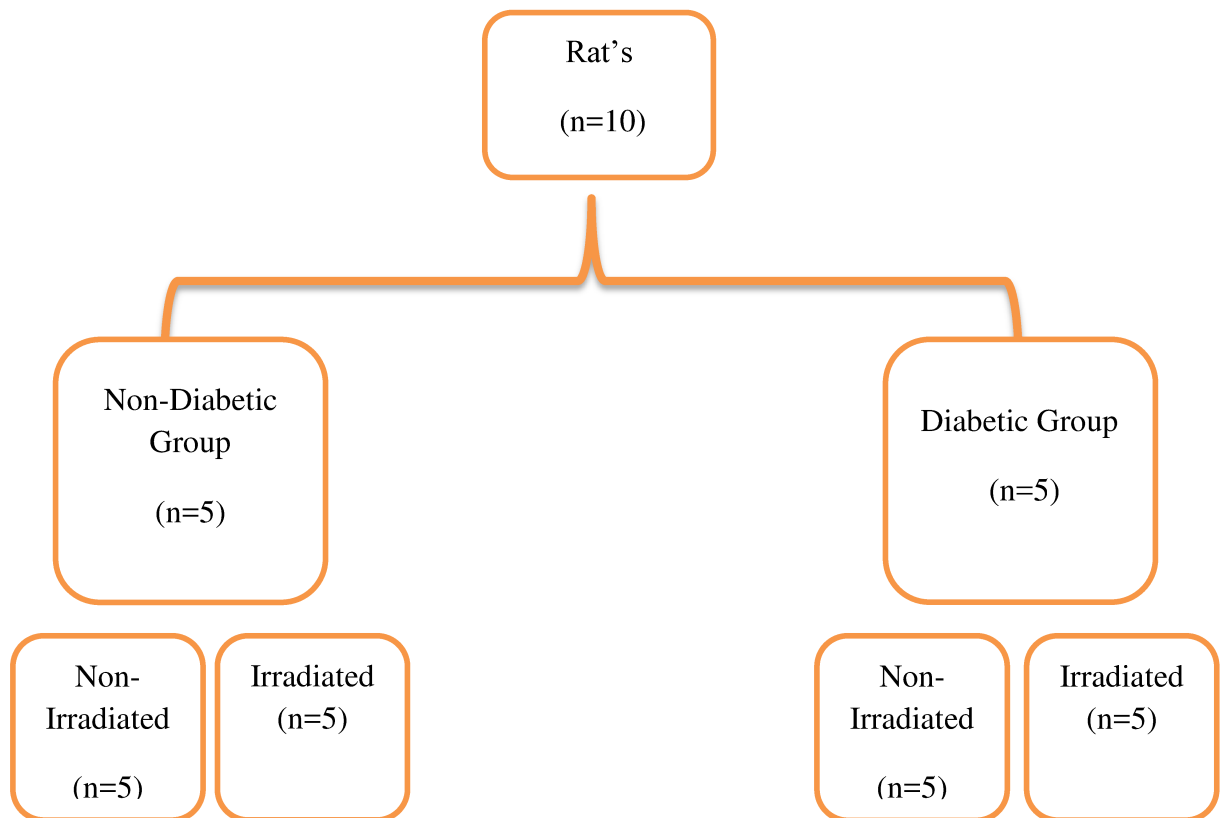
Induction of diabetes.

This study was carried out in accordance with recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian Society of Laboratory Animals Science (SBCAL). All experimental procedures for the handling, use and euthanasia were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia (UFU) (License #CEUA-UFU No. 013/2016) according to Ethical Principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). All effort was taken to minimize the number of animals used and their discomfort. The Wistar rats (250g) were obtained from Center for Bioterism and Experimentation at the Federal University of Uberlândia.

Ten rats were maintained under standard conditions (22 ± 1 °C, $60\% \pm 5\%$ humidity and 12-hour light/dark cycles, light on at 7 AM) and were allowed with free access to standard diet and water at the Institute of Biomedical Sciences rodent housing facility (Nuvilab CR-1; Nuvital, Curitiba, Brazil).

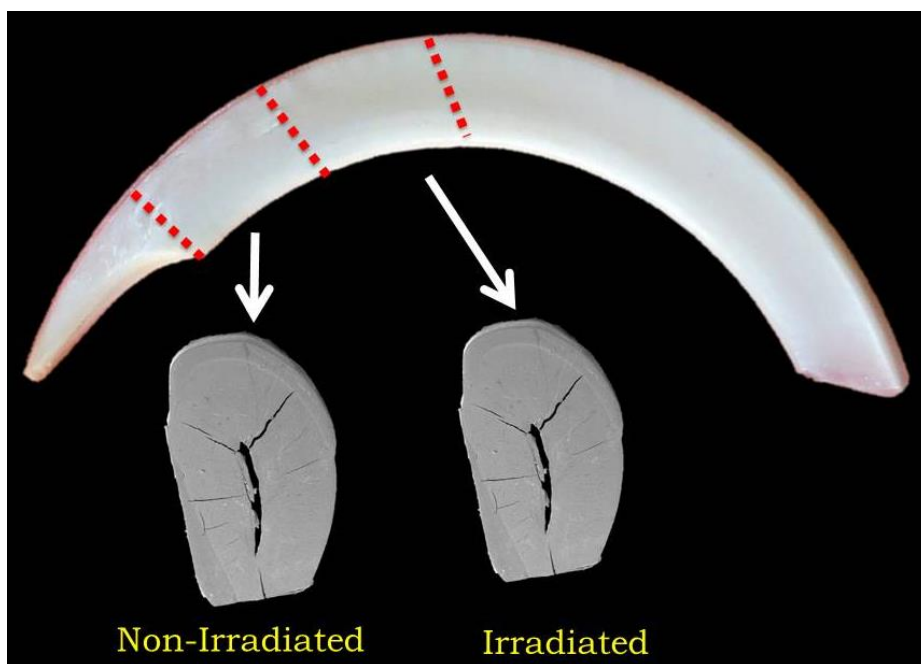
Animals were divided in: non-diabetic (ND) and diabetic (D). Non-diabetic rats were submitted to placebo treatment, which was intraperitoneal injection with vehicle saline solution and diabetes was induced in overnight-fasted animals by an intraperitoneal injection (60 mg/kg) of streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). Animals with hyperglycemia (>250 mg/dl) were chosen as diabetics [14]. Measurements glycemc were made at the beginning and at the end of treatment. Glucose levels in overnight-fasted were obtained from the tail vein and measured using reactive strips (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland). After twenty-eight days, the animals were euthanized and submitted of treatment by intraperitoneal injection with sodium thiopental and lidocaine, followed by cervical dislocation, in compliance with the principles of the Universal Declaration on Animal Welfare.

The left hemi-jaws were removed and submerged in 0.9% saline solution and frozen. The incisor teeth were extracted from the hemi-jaws and cleaned with periodontal currettes for the removal of organic remains. The teeth were stored in deionized water at 4°C until the incisor preparation.



Specimens' preparation

All teeth were sectioned transversally into two slices of 3 mm each one using a water-cooled diamond precision saw (Isomet; series 15HC diamond; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) and a precision saw (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). The slices were divided into 2 subgroups according to the irradiation therapy: non-irradiated and irradiated (n=5). The specimens of irradiated groups were submitted to the protocol that consisted of a total of 72 Gy, with 1.8 Gy applied 5 days per week, during 8 weeks with X-rays from a linear accelerator (Clinac 600C Varian® Palo Alto, CA, EUA, Beam 6 MV). Specimens were submerged in deionized water during radiotherapy (da Cunha et al., 2016; Rodrigues et al., 2018). The placement of the beam and the radiation dose was calculated based on a mean that are usually applied on patients with head and neck tumors, used in the radiotherapy sector from the Hospital of the Federal University of Triangulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.



Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Chemical composition was evaluated for each group using Attenuated Total Reflectance/Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR/FTIR; Vertex 70, Bruker, Ettlingen, Germany). The absorbance spectrum was acquired by scanning the specimens 32 times over at 4,000 to 400 cm^{-1} range with a resolution of 4 cm^{-1} and then analyzed

by OPUS 6.5 (Bruker, Ettlingen, Germany). Each test surface was carefully positioned against the diamond crystal of the ATR unit, and a constant pressure was applied to facilitate contact. After baseline correction and normalization, the FTIR spectra were analyzed by calculating the following parameters: amide I/phosphate (band ratio between C = O stretching of collagen amide I to the vibration ν_1 , ν_3 of the phosphate ion; carbonate/mineral ratio (the ratio of the integrated areas of carbonate ν_2 at 872 cm^{-1} to the phosphate ν_1 , ν_3 at 1035 cm^{-1}); amide I/amide III ratio (the ratio of the integrated areas of amide I at 1655 cm^{-1} to the amide III at 1235 cm^{-1}); amide I/CH₂ (the band ratio of the integrated areas of amide I at 1655 cm^{-1} to the CH₂ scissoring at 1450 cm^{-1}) [15, 16].

X-ray Energy-Dispersive Spectroscopy (EDS)

The specimens were sputter-coated (Balzers SDC 050 - Oerlikon Balzers, Balzers, Liechtenstein) prior to analysis. Elemental analysis of dentin was performed using an EDS (X-act, Oxford Instruments) spectrometer equipped with a rhodium X-ray tube and a liquid nitrogen (N₂) cooled semiconductor detector, operating at 15 kV. Chemical characterization (wt%) was performed and the concentrations of the following elements were evaluated: Phosphorus (P), Calcium (Ca) and Calcium/Phosphorus ratio (Ca/P).

Microindentation test

The specimens were embedded in polyester resin (Instrumental Instrumentos de Medição Ltda, São Paulo, SP, Brazil) (Soares *et al.*, 2014). The specimen's surfaces were sanded with silicon-carbide abrasive papers (#600, 800, 1200, 1500 and 2000 grit sizes; Norton, Campinas, SP, Brazil) and polished with felt discs and metallographic diamond pastes (6-, 3-, 1-, and ¼- μm sizes; Arotec, São Paulo, SP, Brazil) (Soares *et al.*, 2014). The specimens were washed with deionized water and cleaned ultrasonically in absolute alcohol for 5 minutes between each metallographic diamond paste polishing procedure. The Knoop hardness analysis of the dentin were performed using a microhardness tester (HMV Micro Tester SHIMADZU). A force of 50g- was applied

for 15 seconds. Three indentations were performed on dentin with 40 μm from the amelodentin junction and a minimum distance of 40 μm between indentations.

Statistical analysis

Data were subjected to analysis of normality using the Shapiro–Wilk and Levene's tests. ATR/FTIR, EDS and Microhardness data were evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA), considering the factors radiotherapy and diabetes, followed by Tukey post-hoc test ($\alpha < 0.05$) with sigma Plot statistical package (version 12.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

Results

FTIR analysis

Mean and standard deviation values of the integrated areas for the chemical components analyzed in ART/FTIR did not showed significant difference and are presented in Table 1. The means and standard deviations values for the chemical parameters of the amide I/phosphate, carbonate/phosphate, amide I/amide III and amide I/CH₂ ratios evaluated are shown in Table 2. For amide I/phosphate and amide I/amide III ratios, two-way ANOVA revealed no statistical significant difference. For carbonate/phosphate ratio, the irradiation was significant ($p = 0.013$), while the diabetes ($p = 0.082$) and the interaction between the study factors was not ($p = 0.374$). Tukey's post hoc test revealed that with the radiation, the carbonate/phosphate ratio increased for both groups. Two-way ANOVA showed that the diabetes ($p = 0.004$) influence significantly the amide I/CH₂ ratio, while the irradiation ($p = 0.852$) and the interaction between them had no influence ($p = 0.106$). Tukey's post hoc test showed a decrease for amide I/CH₂ values for diabetes.

Table 1 - Means and standard deviations of the integrated areas of each chemical component analyzed in the FTIR.

Dia	Amide I	Phosphate	Amide III	CH ₂	Carbonate
-----	---------	-----------	-----------	-----------------	-----------

Diabetic Melitus	Non-Irradiated		Non-Irradiated		Non-Irradiated		Non-Irradiated		Non-Irradiated			
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
ND	3.7	0.5	4.2	0.5	19.5	19.4	0.5	0.5	0.9	0.9	1.8	2.6
D	3.7	0.6	4.5	0.7	20.0	18.2	0.6	0.7	1.2	1.3	1.6	1.9
	(1.5)	(0.2)	(1.3)	(0.3)	(1.1)	(1.0)	(0.2)	(0.3)	(0.2)	(0.4)	(0.3)	(0.8)

Table 2 - Mean and standard deviation values of the Amide I/Phosphate, Carbonate/Phosphate, Amide I/Amide III and Amide I/CH₂ ratios.

Diabetic Melitus	Amide I/Phosphate		Carbonate/Phosphate		Amide I/ Amide III		Amide I/CH ₂	
	Non-Irradiated	Irradiated	Non-Irradiated	Irradiated	Non-Irradiated	Irradiated	Non-Irradiated	Irradiated
ND	0.19	0.22	0.09	0.14	8.03	8.44	4.03	4.83
	(0.01)	(0.10)	(0.01)	(0.01)	(1.30)	(1.30)	(0.20)	(1.00)
	Aa	Aa	Ab	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa
D	0.18	0.25	0.08	0.10	7.39	6.54	3.86	3.62
	(0.11)	(0.10)	(0.01)	(0.01)	(2.20)	(1.50)	(0.40)	(0.20)
	Aa	Aa	Ab	Aa	Aa	Aa	Ba	Ba

*Different uppercase letters show significant differences in vertical (Diabetics presence). Different lowercase letters show significant differences in horizontal (Irradiation).

EDS analysis

The mean concentrations by weight of P (phosphorus), Ca (calcium) and Ca/P ratio are shown in Table 3. Two-way ANOVA showed that for the diabetes was significant for P ($p < 0.001$) and Ca ($p < 0.001$). For Ca and P content, the interactions between the studied factors were not significant. Ca and P concentrations in the dentin

of the diabetic groups were lower compared with non-diabetic, irrespective of irradiation. In addition, no significant differences were found among the Ca/P ratio irrespective of the studied factor.

Table 3 – Mean and standard deviation concentration values by weight of the chemical elements Mg, P, Ca and Ca/P ratio.

Diabete Melitus	P		Ca		Ca/P	
	Non-Irradiated	Irradiated	Non-Irradiated	Irradiated	Non-Irradiated	Irradiated
ND	16.0 (0.6) Aa	16.8 (3.8) Aa	25.2 (0.6) Aa	24.5 (1.2) Aa	1.6 (0.0) Aa	1.6 (0.0) Aa
D	14.2 (0.4) Ba	13.9 (1.4) Ba	22.6 (0.7) Ba	22.2 (1.7) Ba	1.6 (0.7) Aa	1.6 (0.1) Aa

*Different uppercase letters show significant differences in vertical (Diabetics presence). Different lowercase letters show significant differences in horizontal (Irradiation).

Microhardness analysis

The means and standard deviations for the Knoop Hardness values are shown in Table 3. Two-way ANOVA revealed statistical significance for irradiation ($p < 0.001$) and for diabetes ($p < 0.001$), while the interaction between the factors was not significant ($p = 0.106$). Tukey's test showed a higher Knoop hardness value for ND groups, irrespective of radiation. The Knoop hardness values decreased significantly with radiation.

Table 4 - Mean and standard deviation values of Knoop Hardness.

Diabete Melitus	Non-Irradiated	Irradiated
ND	64.5 (3.1) Aa	45.7 (8.3) Ab
D	38.5 (4.5) Ba	33.8 (11.7) Bb

*Different uppercase letters show significant differences in vertical (Diabetics presence). Different lowercase letters show significant differences in horizontal (Irradiation).

Discussion

The null hypothesis tested in this study was rejected. The radiation used for radiotherapy treatment altered the chemical composition and the hardness of the dentin of rats with T1DM. Experimental models in rats have been used to evaluate the effects of diabetes, been possible to control some variables. Studies have investigated the prevalence and severity of dental caries, alterations in the mineral content of dentin and alterations of microhardness of teeth of rats [17, 11, 10]. In addition, changes in calcium, zinc, phosphorus, fluoride, and potassium concentrations in the presence of diabetes have been showed [10, 12, 17]. The incisors from rats continually grow and may exhibit all stages of tooth formation at any time [18]. The age range for the experimental rat's was between 3 and 8 weeks of age, because this time-period

corresponds to the early growth stage in humans [14] that are usually affected by diabetes mellitus type I [13].

For understanding the results obtained by methodologies that investigate dental physical properties depends on the knowledge of the tooth structure. The mineral phase is an impure form of hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ because its lattice structure facilitates the incorporation of inorganic elements, which are absent in the pure compound [19]. The hydroxyapatite structure allows ionic substitutions very easily. Calcium can be substitute for another element; phosphate group can be substitute for carbonates; and hydroxyls can be substitute for carbonates and fluoride [20]. Then, this substitution causes deformations in the crystalline lattice structure [20].

FTIR, is an useful and non-destructive method for analysis of chemical composition of the tooth structure, performing the measurement of the wavelength and intensity of the absorption of infrared light. In this study, FTIR analysis showed the increase in carbonate level after irradiation, affecting the carbonate/phosphate ratio, which is an indicator of the degree of incorporated carbonate in hydroxyapatite [21]. Increasing carbonate content, can cause crystalline deformation and make the tissue that more soluble in acid [15]. Furthermore, in this study lowest values of amide I / amide III and amide I / CH_2 were found in the diabetic group. According to other study, lower amide I/amide III values reveal the change in the organization of collagen and lower amide I/ CH_2 , which indicates the alteration on collagen quality (Toledano *et al.*, 2015). Considering that collagen is the most abundant protein of dentin (90%) [16], its alteration impact on the integrity of this tissue, which can explain the decreasing on the hardness values.

EDS methodology has been used to analyze the composition of dental structure [22]. The Ca is an essential element that is involved in most metabolic processes, and associated with phosphate provides mechanical rigidity to the bones and teeth [18]. Some studies have established that T1DM is associated with oral complications and depression of natural defenses against infection [12, 23]. However, little attention has been focused on the effect of this condition on dental hard tissues [10]. In the present study, mineral content alterations, represented by lower values of Ca and P, were observed in the dentin of diabetic rat's. It is in accordance with others investigations,

which showed low concentration of Ca, P and F in the incisors of rodents after induction of diabetes [11, 22]. It is speculated that the metabolic functions of ameloblasts and odontoblasts may be hampered by the elevated blood glucose level associated with the disease condition [10]. Then, a possible mechanism of change in the elemental composition of teeth is the disorder in ion transport, mainly Ca, due to the increase in glucose levels, and the oxidative stress associated with hyperglycaemia [11]. The low concentration of Ca and P ions may lead to a decrease in hardness values of the diabetic groups. This change in tooth hard tissues may predispose the animals to later cariogenic changes [24].

Chemical composition and mechanical properties of teeth are interrelated. [4, 11]. The present results showed decrease of microhardness for diabetics and irradiated groups. The decrease of inorganic phase showed by EDS, added to the increased solubility of dentin due to higher carbonate concentrations, results in further exposure of the dentin collagen [4]. The radiolysis is an important aspect for radiotherapy, wherein radiation interacts with water and generate the hydrolysis of unprotected collagen fibrils [25]. The decarboxylation-related changes on a molecular level may affect the mineral content, composition, structure, and subsequently mechanical properties [4]. Some studies also showed reduction in dentin microhardness after radiation. [5, 26].

The experimentally induced diabetes and irradiation in animals as well as clinically in patients may produce complications in the oral cavity. Some studies have shown that diabetes mellitus type I and radiotherapy analyzed independently of each other present a rate of oral complications [4, 5, 11], however there are no studies that have analyzed the association of one with the other. More studies are needed to evaluate both associated comorbidities; since it probably causes an exacerbation of side effects. Also, further studies are recommended to promote the prevention of damage to dental tissues and improve quality of life for this risk group.

Conclusions

Diabetes and the irradiation used for radiotherapy altered the chemical composition of dentin by altering the mineral phase of rat's dentin, reducing the microhardness. The destructive potential of radiation in the head and neck region added

to diabetes mellitus may cause adverse consequences to the oral hard tissues and oral function.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Department of Clinical Oncology at UFTM, Federal University of Triângulo Mineiro, MG, Brazil, to Mechanical Engineering of the Federal University of Uberlandia and to the Center for Biomechanical, Biomaterial and Cell Biology Dental Research-

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). The authors acknowledge the financial support given by FAPEMIG and CNPq. The authors would like to express their gratitude to the Faculty of Dentistry of the Federal University of Uberlândia and the Triângulo Mineiro Uberaba Hospital for supporting this research.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Ethical approval: All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia (UFU) (License #CEUA-UFU No. 013/2016) according to Ethical Principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Referencias

1. Campi LB, Lopes, CF, Soares LES, de Queiroz AM, de Oliveira HF, Saquy PC, de Sousa-Neto MD (2018). Effect of radiotherapy on the chemical composition of root dentin. Wiley DOI: 10.1002/hed.25493
2. Jawad H, Hodson NA, Nixon PJ (2015) A review of dental treatment of head and neck cancer patients, before, during and after radiotherapy: part 1. *Br Dent J* 218, 65-8.
3. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C. & Allen, C. (2017) Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 3, 524.
4. Seyedmahmoud R, Wang Y, Thiagarajan G, Gorski J P, Edwards R, McGuire JD, Walker MP (2018) Oral cancer radiotherapy affects enamel microhardness and associated indentation pattern morphology. *Clinical Oral Investigations* 22, 1795–1803.
5. Gonçalves LMN, Palma-Dibb RG, Paula-Silva FWG, de Oliveira HF (2014) Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. *Journal of dentistry*, 42, 986–992
6. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP (2003) Oral sequela of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14(3), 199–192.
7. Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PC, Naves LZ, Pereira PN. (2010) Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. *J Dent Res* 89(2):159-64.
8. Rodrigues RB, Soares CJ, Simamoto-Junior PC, Lara VC, Arana-Chavez, VE Novais VR (2018) Influence of radiotherapy on the dentin properties and bond strength. *Clin Oral Investig* 22(2), 875-83.
9. Velo, M.M.A.C., Farha, A.L.H., da Silva, S.P.S., Shiota, A., Sansavino, S.Z., Souza, A.T.F., Honório, H.M. & Wang, L. (2018). Gamma radiation increases the risk of radiation-related root dental caries. *Oral Oncol*, 71, 184–185.
10. Abbassy MA, Watari, Bakry AS, Hamba H, Hassan AH, Tagami J. & Ono T (2015) Diabetes detrimental effects on enamel and dentine formation. *Journal of dentistry*. 43, 589–596.
11. Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Rybicka M, Nocoń I, Dudzińska W, Marchlewicz M, Wiszniewska B Chlubek D (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. *Biol Trace Elem Res*, 139, 332–340
12. Chałas R, Rudzka O, Wójcik-Chęcińska I, Vodanović M (2015) The impact of type 1 diabetes on the development of the craniofacial mineralized tissues (bones and teeth): literature review. *Folia Morphol*. Vol. 75, No. 3, pp. 275–280

13. Valikangas L, Pekkala E, Larmas M, Risteli J, Salo T, Tjaderhane L (2001). The Effects of High Levels of Glucose and Insulin on Type I Collagen Synthesis in Mature Human Odontoblasts and Pulp Tissue in vitro. *Adv Dent Res* 15, 72-75.
14. Abbassy, M.A., Watari, I., & Soma, K. (2008). Effect of experimental diabetes on craniofacial growth in rats. *Archives of Oral Biology* 2008;53:819–25.
15. Lopes CCA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P (2018) Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Applied Spectroscopy Reviews* <https://doi.org/10.1080/05704928.2018>.
16. de Miranda, R.R., Silva, A.C.A., Dantas, N.O., Soares, C.J. & Novais, V.R. et al (2018) Chemical analysis of in vivo-irradiated dentine of head and neck cancer patients by ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Clinical Oral Investigations*. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2758-6>
17. Sano T, Matsuura T, Ozaki K, Narama I, et al. (2011). Dental caries and caries-related periodontitis in type 2 diabetic mice. *Veterinary Pathology*, 48, 506–512
18. Ozbek M, Dura S, Kanli A, Tunce M, Orhan J (2009) Morphological evaluation of rat incisor enamel and dentin induced by pregnancy and lactation using a scanning electron microscope *Vet Med Sci*. 71(10):1273-7.
19. Elliott JC, Wilson RM, Dowker SEP (2002). Apatite structures. *Adv X Ray Anal* 2002;45:172-181
20. Liu Y, Yao X, Liu YW, Wang Y (2014). Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Carious Dentin from Transparent Zone to Normal Zone. *Caries Res*. 48(4): 320–329. doi:10.1159/000356868
21. Boskey AL, Mendelsohn R (2005) Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc* 2005;38:107-114
22. Abbassy MA, Watari I, Soma K. The effect of diabetes mellitus on rat mandibular bone formation and microarchitecture. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 364–369.
23. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR (2004) Update on diabetes mellitus and related oral diseases review article. *Oral Diseases*, 10, 187–200
24. Atar M, Atar-Zwillenberg, DR Verry, P. (2004). Defective enamel ultrastructure in diabetic rodents. *Int J Peadiatr Dent* 14:301–307
25. Kantoor P, Srivastava N, Rana V, Adlakha VK (2015) Alterations in the mechanical properties of the extracted human teeth to be used as biological restorations on storing them in different storage media: an in vitro study. *Dent Traumatol* 31(4):308-13. doi: 10.1111/edt.12158.
26. Marangoni-Lopes L, Rovai-Pavan G, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M (2018) Radiotherapy Reduces Microhardness and Mineral and Organic Composition, and Changes the Morphology of Primary Teeth: An in vitro Study. *Caries Res* 53:296–304 DOI: 10.1159/000493099

Referências

Referências

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

<http://doi.org/10.1002/ijc.25516>

Taubes, G. 2012. Cancer research. Cancer prevention with a diabetes pill? **Science** 335:29. <http://doi.org/10.1126/science.335.6064.29>

Lin CC, Chiang JH, Li CI, Liu CS, Lin WY, Hsieh TF et al. Cancer risks among patients with type 2 diabetes: a 10-year follow-up study of a nationwide population-based cohort in Taiwan. **BMC Cancer**. 2014; 14:381. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-14-381>

Danaei G, Finucane MM, Lu Y et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**. 2011; 378: 31–40. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60679-X

Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. **Diabetes Care**. 2010;7:1674–85. <http://doi.org/10.2337/dc10-0666>

Arcidiacono B, Iiritano S, Nocera A et al. Insulin resistance and cancer risk: an overview of the pathogenetic mechanisms. **Exp Diabetes Res**. 2012; 789174. <http://doi.org/10.1155/2012/789174>

Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Carbohydrates, glycemic index, glycemic load, and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Cancer Causes Control**. 2012. Apr;23(4):521–535. <http://doi.org/10.1007/s10552-012-9918-9>

Wu CH, Wu TY, Li CC, Lui MT, Chang KW, Kao SY. Impact of Diabetes Mellitus on the Prognosis of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Cohort Study. **Ann Surg Oncol**. 2010;17:2175–2183. <http://doi.org/10.1245/s10434-010-0996-1>

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**. 2009; 45:309–16. <http://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2016; 124 p.

Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Tratamento atual do câncer de células escamosas de cabeça e pescoço. **J Surg Oncol.** 2014; 110:551–74. <http://doi.org/10.1002/jso.23724>

Epstein JB, Thariat J, Bensadoun RJ, Barasch A, Murphy BA, Kolnick L, Popplewell L, Maghami E. Oral Complications of Cancer and Cancer Therapy. **CA CANCER J CLIN.** 2012;62:400–422 <http://doi.org/10.3322/caac.21157>

Jham BC, Freire ARS. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. **Rev Bras Otorrinolaringol.** 2006;72(5);p.704-708. [https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)31029-6](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)31029-6)

Spetch L. Oral complications in the head and neck irradiated patient. Introduction and scope of the problem. **Supp Care Dent.** 2002; 10: 36-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992006000500019>

Vissink A; Jansma J; Spijkervet FK; Burlage FR; Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2003;14(3):199–212. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-18462011005000071>

Ray-Chaudhuri A, Shah K, Porter RJ. The oral management of patients who have received radiotherapy to the head and neck region. **British Dental Journal.** 2013; 214: n 8 387-393. <http://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.380>

Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. Radiation-related damage to dentition. **Lancet Oncology.** 2006; 7;p. 326-335. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70658-1](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70658-1)

Buglione M, Cavagnini R, Rosario FD, Sottocornola L, Maddalo M, Vassalli L. et al. Oral toxicity management in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation: Dental pathologies and osteoradionecrosis (Part 1) literature review and consensus statement. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 97. 2016; 131–142. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.010>

Deng J, Jackson L, Epstein JB, Migliorati CA, Murphy BA. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. **Oral Oncology** 51. 2015; 824–831. <http://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.06.009>

Lieshout HFJ, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue - a systematic review. **Clin Oral Invest.** 2014; 18:17–24 <http://doi.org/10.1007/s00784-013-1034-z>

Qing P, Huang S, Gao SS, Qian LM, Yu HY. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth dentin. **Clin Oral Invest.** 2016. <http://doi.org/10.1007/s00784-016-1731-5>

Cacelli EMN, Raport A. Para-efeito das irradiações nas neoplasias de boca e orofaringe. **Rev. Brás. Cir. Cabeça e Pescoço**, v.37, nº 4, p.198-201- 2008.

Hegde M, Tahiliani D, Shetty S, Devadiga D. Salivary alkaline phosphatase and calcium in caries-active type II diabetes mellitus patients: An in vivo study. **Contemporary Clinical Dentistry**. 5.4 .October-December 2014; p440.

<http://doi.org/10.4103/0976-237X.142805>

You WP, Henneberg M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. **BMJ Open Diabetes Res Amp Care** 2016; 4; <http://doi.org/10.1136/bmjdr-2015-000161>

Anexos

Referência do Artigo segundo normas do programa:

Mancia BLP, Lopes CCA, Sabino-Silva R, Novais VR.

Effect of ionizing in head and neck radiation and induced diabetes on the chemical composition and mechanical properties in dentin of rat's. Clinical oral investigations. 2019.