

ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE, C. D.

PERMEABILIDADE DOS VASOS GENGIVAIS EM RATOS
DIABÉTICOS ALOXÂNICOS

Orientador: Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental (Área de Patologia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA - S. P.
- 1988 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais,

JURACY e OLAVO.

A

ANITA e DEBORA.

Ao Prof.Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA, Professor Titular da
Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba-UNICAMP, pela orientação segura deste
trabalho, bem como ao interesse e presença constante
durante todo o curso, demonstrando sempre, o verdadeiro
sentido da pesquisa científica.

AGRADECIMENTOS.

A Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, na pessoa de seu Ex-Diretor, Prof.Dr. SYLVIO SIMÕES, e de seu atual Diretor, Prof.Dr. ANTENOR ARAÚJO, pela oportunidade que nos foi concedida para a realização do curso.

Ao Prof. Dr. GUILHERME BLUMEN, Coordenador do Curso de Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental, Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

Aos Profs.Drs. LOURENZO BOZZO e MARIO ROBERTO VIZIOLI, da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

Aos demais professores do Curso de Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental, que sempre procuraram transmitir seus conhecimentos e experiências, durante o decorrer do curso.

A Profa.Dra. TEREZINHA DE OLIVEIRA NOGUEIRA, Chefe do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

Aos Profs.Drs. NEIDE QUERIDO DE ALMEIDA, MARIO TSUNEZI SHIMIZU, VERA FANTINATO DAMETTO e CARMELINDA SCHMIDT UNTERKIRCHER, da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela boa vontade e compreensão durante nosso afastamento para realização deste curso.

Ao Sr. PEDRO DUARTE NOVAES e a Sra. MARIA HELENA DE VASCONCELOS PERON, técnicos do laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela ajuda imprescindível e constante, durante o desenvolvimento da fase experimental e documentação fotográfica deste trabalho.

A Profa. MARLY CARDOSO DE ALMEIDA, pela revisão ortográfica do texto.

Aos colegas de curso, VANESSA MONTEIRO PEDRO, MARIA RITA MASSELLI, PEDRO DUARTE NOVAES, MARCO ANTONIO SAAVEDRA FRANCO e MARCOS ANTONIO DE ALMEIDA LEME, cuja gratificante convivência transformou-nos em verdadeiros amigos.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, e a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o auxílio de bolsa de estudos do Programa Institucional de Capacitação Docente (P.I.C.D./CAPES), UNESP.

INDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.	
2.1. Diabetes e inflamação	04
2.2. Diabetes aloxânico	08
2.3. Efeitos do diabetes nos tecidos periodontais	16
2.4. Efeitos do diabetes na permeabilidade vascular	23
2.5. Permeabilidade dos vasos gengivais ...	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.	
3.1. Animais	33
3.2. Diabetes experimental	35
3.3. Contagem total e diferencial de leucócitos	34
3.4. Permeabilidade vascular na pele	35
3.5. Permeabilidade vascular no músculo cremâster	36
3.6. Permeabilidade vascular nos vasos gengivais	37
3.7. Análise estatística	38

4.	RESULTADOS.	
4.1.	Diabetes experimental	41
4.2.	Contagem total e diferencial de leucócitos	42
4.3.	Permeabilidade vascular na pele	44
4.4.	Permeabilidade vascular no músculo cremâster	46
4.5.	Permeabilidade vascular nos vasos gingivais	48
5.	DISCUSSÃO	54
6.	CONCLUSÕES	70
7.	RESUMO	72
8.	SUMMARY	72
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
10.	APÊNDICE	93

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO.

Está bem estabelecido que o diabetes melito pode modificar a resposta inflamatória, predispondo o indivíduo a maior susceptibilidade à infecções e provocando significativo retardo no processo de reparo. Embora os mecanismos ainda não sejam bem conhecidos, há evidências de que no diabetes há diminuição da permeabilidade vascular, e isto ocorre devido a não abertura das junções epiteliais, processo que dependeria da presença de insulina (GARCIA LEME e cols., 1973, 1974).

A influência do diabetes no desenvolvimento da doença periodontal é assunto controverso, entretanto alguns autores têm relatado maior severidade da doença em pacientes diabéticos (BELTING, HINIKER e DUMMETT, 1964; COHEN e cols., 1970; BERNICK e cols., 1975; SZNAJDER e cols., 1978), e em animais de laboratório (BISSADA, SCHAFFER e LAZAROW, 1966; PETTIGREW e cols., 1980; NASCIMENTO e cols., 1985; REUTERVING, HAGG e GUSTAFSON, 1986). PAGE e HAHN (1948), não observaram alterações na membrana periodontal e osso alveolar em ratos diabéticos, entretanto existem dados indicando diminuição da migração celular através do epitélio juncional (RAMAMURTHY e cols., 1979), maior degradação de colágeno gengival (RAMAMURTHY, ZEBROWISKI e GOLUB, 1972 e 1974; SCHNEIR, RAMAMURTHY e GOLUB, 1984) e aumento da perda óssea (GLIKMAN, 1946; RAMAMURTHY e cols., 1973; ROSE, 1973).

Os neutrófilos que migram para o sulco gengival, assim como os componentes plasmáticos que permeiam o tecido gengival têm sido extensivamente estudados, pois devem exercer importante papel na manutenção da saúde periodontal. O fluido gengival é formado constantemente através de vasos com permeabilidade aumentada, e que apresentam junções endoteliais abertas (EGELBERG, 1966a,b,c,d,e; ALMEIDA e BÜHM, 1978). Os fatores envolvidos neste aumento de permeabilidade não são conhecidos, e é possível que mediadores e mecanismos diferentes dos que participam em outros tipos de inflamação estejam operando. Como a insulina é importante no aumento da permeabilidade vascular na pele e no cremâster (GARCIA LEME e cols., 1974), o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do diabetes e conseqüentemente o papel da insulina na permeabilidade dos vasos gengivais de rato.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. DIABETES E INFLAMAÇÃO.

O diabetes melito é um distúrbio metabólico genético caracterizado por falta absoluta ou relativa de insulina, que resulta num defeito de utilização de carboidratos, e alterações do metabolismo de lipídeos e proteínas (ROBBINS, 1974). Distúrbio no metabolismo dos carboidratos, com incapacidade de armazenamento de glicogênio no fígado, acarreta excessivo acúmulo de glicose no sangue (hiperglicemia) e excreção excessiva de açúcar na urina (glicosúria); enquanto que, os lipídeos deixam de ser completamente oxidados, devido às alterações em seu metabolismo, levando ao acúmulo de corpos cetônicos com consequente acidose (ANDERSON e SCOTTI, 1976).

A glicose e os ácidos graxos livres, são as fontes primárias e imediatas de energia no organismo. No diabetes melito, como o metabolismo carboidrático e a síntese de ácidos graxos ficam-se prejudicados, o diabético apoia suas necessidades energéticas no metabolismo dos lipídeos armazenados ou, oriundos da dieta, produzindo assim, quantidades excessivas de acetil-CoA e corpos cetônicos (ácido acetoacético, ácido beta-hidroxibutírico e acetona), o que resulta em cetose e acidose. Na neutralização e excreção de ácidos orgânicos perde-se sódio e potássio,

parte do acetil-CoA acumulado é desviado para a síntese excessiva de colesterol, e os processos anabólicos, tais como síntese de glicogénio, proteínas e triglicéridos tornam-se diminuídos. Os pacientes diabéticos são frequentemente desidratados e têm graves distúrbios eletrolíticos.

Os diabéticos apresentam maior suscetibilidade às infecções, mas os mecanismos biológicos e bioquímicos ainda não estão totalmente elucidados. O diabético parece não ser mais vulnerável à invasão bacteriana, mas, uma vez invadido, apresenta maior probabilidade de desenvolver uma infecção clinicamente significativa. Diabéticos são mais propensos à tuberculose e às infecções cutâneas e do trato urinário (ROBBINS, 1974). Esta vulnerabilidade aos agentes microbianos não é simplesmente relacionada à hiperglicemia; a combinação de microangiopatia, acidose metabólica e, fagocitose ineficaz pelos macrófagos, segundo ROBBINS (1974), contribuem para a vulnerabilidade às infecções.

O diabético é particularmente propenso a desenvolver lesões em vasos de todos os calibres. O espessamento da parede de arteríolas, não é somente mais comum entre diabéticos, mas também tende a ser mais grave (HOVE e STALLARD, 1970). Para BLUMENTHAL (1968), o espessamento da parede vascular é uma consequência de muitas alterações: hialinização amorfa da parede arteriolar, espessamento da membrana basal, proliferação endotelial e de pericitos e,

depósitos de mucopolissacarídeos PAS positivos. O espessamento da parede de pré-capilares, capilares e vénulas (microangiopatia), é um quadro característico na maioria dos diabéticos (GANDA, 1980). O aumento da espessura das paredes dos vasos, para HOVE e STALLARD (1970), pode determinar conseqüente redução na velocidade de circulação sanguínea, com decréscimo na difusão de oxigênio e acúmulo de metabólitos, influenciando conseqüentemente no processo inflamatório.

Entre as alterações bucais provocadas ou associadas ao diabetes, segundo ROBBINS (1974), pode-se citar : ressecamento e alterações sensitivas da boca, eritema da mucosa oral, língua espessada e avermelhada, papilas gengivais edemaciadas, tendência à formação de abscessos e doenças destrutivas crônicas do periodonto. Contudo, ainda não foi comprovado que as alterações orais atribuídas ao diabetes sejam realmente provocadas por esta doença, se são preexistentes, ou devidas a presença de fatores locais.

No diabetes melito, segundo SHAFER, HINE e LEVY, (1985), há um retardo clinicamente evidente na reparação das feridas cirúrgicas, inclusive nas extrações dentárias. Nos pacientes diabéticos, as feridas cicatrizam de modo lento e, com frequência apresentam complicações no processo de reparação.

Embora suscetibilidade à infecções mais graves e cicatrizações mais demoradas sejam características do

diabetes (GLIKMAN, SMULOW e MOREAU, 1967), inflamações mais severas no periodonto e demais tecidos da cavidade oral, observadas nesta doença, provavelmente sejam provocadas por fatores locais.

2.2. DIABETES ALOXANICO.

O diabetes experimental foi conseguido pela primeira vez em animais de laboratório, por MERING e MINKOWSKI (1889), através de pancreatectomia. Foi produzido também por administração de extrato hipofisário; infusão contínua de glicose; soro anti-insulínico (COVIAM, 1946) e por drogas, sendo que DULIN e SORET (1977), relatam vários compostos com ação diabética. Dentre as drogas, a aloxana tem sido a mais utilizada (DUNN e cols., 1943; GOMORI e GOLDNER, 1943; KASS e WAISBREN, 1945; GLICKMAN, 1946; COVIAN, 1946; BAILEY e LECOMPTE, 1947; BANERJEE, 1947; LUCKENS, 1948; LAZAROW, 1952; HOUSE, 1958; ADAMKIEWICZ e ADAMKIEWICZ, 1959; MANSFORD e OPIE, 1968; GARCIA-LEME e cols., 1973; DULIN e SORET, 1977; MC NAMARA e cols., 1982; RAMAMURTHY e cols., 1985). A estreptozotocina, um antibiótico produzido pela fermentação de culturas de *Streptomyces achromogenes*, atualmente sintetizado em laboratório, também tem sido amplamente utilizado (MANSFORD e OPIE, 1968; GANDA, ROSSINI e LIKE, 1976; DULIN e SORET, 1977; HANAM, SINGLETON e RUDEK, 1983; SCHNEIR, RAMAMURTHY e GOLUB, 1984; JOHNSON, 1985; ANDERSON e GARRETT, 1986).

A aloxana foi produzida em laboratório em 1838 por WOEHLER, através da oxidação do ácido úrico. Em 1937, JACOBS injetou aloxana (70 mg/kg de peso corporal) intraperitonealmente em coelhos, e relatou taxas de

hipoglicemia abaixo de 70 mg%, três a quatro horas após a injeção, que persistia durante 12-24 horas, ocorrendo convulsões na maioria dos animais, principalmente quando a glicemia alcançava taxas de 35 mg%. O autor não relatou efeitos hiperglicemiantes, afirmando que os animais retornavam ao estado normal rapidamente, não encontrando explicações para o efeito hipoglicemiante da aloxana.

DUNN e cols. (1943), relataram necrose das ilhotas de Langerhans no pâncreas, e alterações da taxa de glicose na urina e no sangue de coelhos, por efeito da aloxana. Estes autores, injetaram diferentes doses de aloxana em coelhos, observando que quando a mesma era injetada intravenosamente e em quantidades suficientes, produzia necrose seletiva das ilhotas pancreáticas, sugerindo que alterações semelhantes poderiam eventualmente ocorrer no diabetes melito.

GOMORI e GOLDNER (1943) verificaram que uma única injeção intraperitoneal de 200 mg/Kg de peso corporal de aloxana em ratos, produzia diabetes tipo melito. Histologicamente, segundo os mesmos autores, ocorria necrose e completo desaparecimento das células beta das ilhotas de Langerhans.

A partir de 1943, numerosos estudos foram relatados, em várias espécies de animais, com diferentes doses de aloxana, conforme pode ser observado no quadro I.

ANIMAL	LESÃO ILHOTAS (observada)	GLICOSÚRIA	DOSE mg/kg peso	VIAS DE INOCULAÇÃO	DURAÇÃO (meses)	REFERÊNCIAS
RATO	+	+	100-200	ip, sv, so.	2-6	BAILEY & LECOMTE, 1947; LUKENS, 1948; DULIN & SORET, 1977.
COELHO	+	+	25-300	ip, sv.	5-11	REIDALL & SOIM, 1945; CUVYAN, 1948; LEWIS, MOSES & SCHREIBER, 1947; HANERJEK, 1947; BAILEY & LECOMTE, 1947; DULIN & SORET, 1977.
HAMSTER	+	+	40-200	ip, sv.	-	LUKENS, 1948; HOUSE, 1958.
CANARINHO	+	+	70-300	ip, sv, so.	-	HUANGSIRI, 1949; MATARASE & INGALLS, 1963; HEAUF & TARDING, 1968; DULIN & SORET, 1977.
CAO	+	+	50-200	sv.	8	GOLDNER & GOKCHI, 1943; BAILEY & LECOMTE, 1947; DULIN & SORET, 1977.
GATO	+	+	150	sv.	-	RUSSH & YARBURIAN, 1946; LUKENS, 1948; DULIN & SORET, 1977.
MACAÇO	+	+	50-300	sv.	24	BAILEY & LECOMTE, 1947; MOSE, 1973; DULIN & SORET, 1977.
HOMEM	+	+	100-600	sv.	-	LUKENS, 1948.
CARRISTO	+	+	80	sv.	-	LUKENS, 1948; DULIN & SORET, 1977.
RA	+	-	500-1000	ip, sv.	-	LUKENS, 1948.
SAPO	0	0	200	ip, sv.	-	LUKENS, 1948.
TARTARUGA	-	-	400	ip, sv.	-	LUKENS, 1948; DULIN & SORET, 1977.
PORCO	+	+	75-200	sv.	-	BAILEY & LECOMTE, 1947; DULIN & SORET, 1977.
GALINHA	0	0	75-400	sv.	-	LUKENS, 1948; DULIN & SORET, 1977.
FRES	0	0	40-200	ip, sv.	-	DULIN & SORET, 1977.

+ presente
 0 ausente
 - dados não descritos
 ip intraperitoneal
 sv endovenosa
 so subcutânea

QUADRO 1 - Diabetes aloxânico produzido em animais, segundo vários autores, levando-se em consideração a lesão produzida nas células das ilhotas de Langerhans; a hiperglicemia acima de 250 mg%; a dose em mg/Kg de peso corporal; as vias de inoculação e o período de duração do diabetes.

Quimicamente a aloxana, um ureído do ácido mesosálico, também chamado de tetraoxihexahidropirimidina, é conhecida em bioquímica como um composto do ácido úrico que pode ser formado pela ação do ácido nítrico. Apresenta-se, segundo GLICKMAN (1946), com a seguinte fórmula :



BAILEY e LECOMPTE (1947) descreveram a ação da aloxana em animais de laboratório, logo após cinco minutos da injeção como, apresentando visível redução no número de grânulos citoplasmáticos nas células beta e, após uma hora tais células apresentavam núcleos contraídos e desintegração citoplasmática visível. Após 24 horas as células beta centrais estavam completamente destruídas e o centro das ilhotas apresentavam somente resíduos celulares envolvidos por um colar de células alfa intactas. A lesão crônica encontrada 2 meses após a inoculação mostraram as ilhotas menores que o normal e compostas apenas de células alfa.

Segundo DULIN e SORET (1977), quando a aloxana é injetada em animais de laboratório produz efeito trifásico, com hiperglicemia inicial, que é rápida e ocorre em função direta da aloxana no fígado. Segue-se hipoglicemia, que

perdura de 6 a 12 horas após a injeção e que caracteriza-se pelo aumento nos níveis plasmáticos de insulina, devido a liberação de grande quantidade da mesma pelas células beta, e também por incapacidade do fígado em liberar glicose. Na terceira fase, aproximadamente 24 horas após a inoculação da droga, ocorre hiperglicemia e necrose das células beta das ilhotas pancreáticas.

No homem, segundo BAILEY e LECOMPTE (1947), a aloxana foi empregada na tentativa de eliminar carcinomas das ilhotas de Langerhans, entretanto, segundo esses autores, seu uso deve ser condenado pois pode produzir necrose no tecido hepático e destruição das ilhotas normais.

A quantidade de aloxana necessária para obtenção do diabetes experimental varia com a espécie animal, com a via de administração, com o peso corporal e com a dieta (Quadro 1). No rato, segundo vários autores (Quadro 2), a aloxana apresenta efeitos diabetogênicos, podendo ser injetada por via endovenosa, subcutânea ou intraperitoneal e em diferentes doses. RUBEN e YARDUMIAM (1946), obtiveram diabetes em gatos, com a administração de aloxana pelo tubo digestivo, ingerida junto com a alimentação, porém sem muito sucesso e com efeitos tóxicos para outros órgãos, principalmente o fígado.

VIA	DOSE	GLICO- SÓRIA	GLICE- MIA	JEJUM (horas)	REFERÊNCIAS
PERITONEAL	120	+	+	12	GOLUB, GARANT e RAMAMURTHY, 1977; RAMAMURTHY e cols., 1979 e 1985; MCNAMARA e cols., 1982.
	150	+	+	-	RAMAMURTHY e cols., 1972 e 1973.
	175	+	+	24	ZIMMERMAN e cols., 1984.
	200	+	+	-	GOMORI e GOLDNER, 1943; LACKEY e cols., 1944; GLICKMAN, SMULOW e MOREAU, 1967.
	200	+	+	12	RAMAMURTHY, ZEBROWSKY e GOLUB, 1974.
ENDOVENOSA	30	+	+	-	BISSADA, SHAFER e LAZAROW, 1966.
	35-40	+	+	0	LAZARROW e PALAY, 1946; LAZAROW, 1952.
	40	+	+	-	SCHER e LAWRENCE, 1971.
	40	+	+	24	GARCIA LEME e cols., 1973 e 1974.
	45	+	+	0	GOTH e cols., 1957.
	50	+	-	-	ADAMKIEWICZ e ADAMKIEWICZ, 1959.
	55	+	+	48	REUTERVING, HAGG e GUSTAFSON, 1986.
	65	+	+	-	MANSFORD e OPIE, 1968.
100	+	+	-	WATANABE e INGALLS, 1963.	
SUBCUTÂNEA	150	+	+	15	NICOLAU, ROSA e FAVA-DE-MORAES, 1969.
	175	+	+	48-60	KASS e WAISBREN, 1945.
	175-350	+	+	-	DUFF e STARR, 1944.
	200	+	+	-	GLICKMAN, 1946.
	250	+	-	-	CHESLER e TISLOWITZ, 1945; BERALDO, DIAS-DASILVA e LEMOS FERNANDES, 1962.
	300	+	-	-	CHESLER e TISLOWITZ, 1945.
	400	+	-	-	CHESLER e TISLOWITZ, 1945.

QUADRO 2 - Diabetes aloxânico em ratos, segundo vários autores, via de inoculação, dose em mg/Kg de peso corporal, glicemia acima de 250 mg% e o período de jejum antes da inoculação.

O diabetes aloxânico pode ser reversível, principalmente quando produzido por pequenas doses (LAZAROW, 1952). Doses excessivas provocam a morte do animal antes mesmo de causar lesões nas células beta e, animais refratários à primeira dose, normalmente também o são às doses subsequentes (GOLDNER e GOMORI, 1943; KASS e WAISBREN, 1945). Entretanto, GLIKMAN (1946), relatou que injeções repetidas da aloxana podem restaurar, manter ou elevar o nível de hiperglicemia resultante da dose inicial em 70% dos animais reinjetados; em 30% dos animais, principalmente aqueles que não responderam à primeira injeção, não foram afetados pelas doses subsequentes. Segundo KASS e WAISBREN (1945), a probabilidade de êxito na obtenção do diabetes é muito maior quando a aloxana é administrada ao animal em jejum. RUANGSIRI (1949), demonstrou que a aloxana provoca lesões na primeira meia hora após a administração em camundongos, e as primeiras manifestações se caracterizam por um contínuo desaparecimento das granulações do citoplasma das células beta, que se estende até 12 horas. Essa fase é chamada de período das degenerações hidrópicas. As modificações nucleares aparecem após três horas, e depois de 8 a 9 horas, os núcleos encontram-se totalmente fragmentados, quando dá-se o início da remoção dos restos celulares através dos macrófagos que invadem a área. O mecanismo de destruição das células beta, segundo DULIN e SORET (1977), ocorre através da ação da aloxana ao nível de

receptores para glicose na membrana citoplasmática das células beta.

O diabetes aloxânico provoca em animais de laboratório: catarata (CHESLER e TISLOWITZ, 1945; BAILEY e LECOMPTE, 1947; LEWIS, MOSES e SCHNEIDER, 1947); lesões da retina (LEWIS, MOSES e SCHNEIDER, 1947); necrose dos túbulos renais (DUFF e STARR, 1944); degenerações gordurosas do fígado e necrose das células hepáticas (HOUSE, 1958); aumento do volume do trato digestivo (CHESLER e TISLOWITZ, 1945); atrofia da tireóide (BENNETT e KONEFF, 1948), lesões na adrenal (KENDALL e cols., 1945; RUBEN e YARDUMIAM, 1946); e, retardo no crescimento somático (CHESLER e TISLOWITZ, 1945).

Como efeitos indiretos, a aloxana provoca poliúria, polidipsia, polifagia e glicosúria (RUANGSIRI, 1949). Provoca também cetose, aumento dos ácidos graxos no plasma e aumento do glicogênio no tecido cardíaco (MANSFORD e OPIE, 1968). LACKEY e cols. (1944), constataram em animais diabéticos por aloxana, que enquanto o glicogênio aumentava no tecido cardíaco, diminuía consideravelmente no fígado e nos músculos.

Entretanto, apesar dos efeitos colaterais, a obtenção de animais diabéticos proporcionou a possibilidade de estudos mais profundos sobre o metabolismo dos hidratos de carbono e suas alterações (COVIAN, 1946), representando o diabetes aloxânico um modelo experimental satisfatório para estudos laboratoriais do diabetes melito em animais.

2.3. EFEITOS DO DIABETES NOS TECIDOS PERIODONTAIS.

As alterações dos tecidos periodontais provocado pelo diabetes têm sido relatados por vários autores, tanto em animais como em seres humanos. Entretanto, a despeito de todos os estudos, ainda não se conhece a exata influência que o diabetes pode causar nos tecidos gengivais ou no agravamento da doença periodontal.

GLICKMAN (1946), em estudo histológico conduzido em 103 ratos diabéticos aloxânicos, relatou as seguintes conclusões em relação ao diabetes e tecidos periodontais: 1) a natureza e incidência de doença gengival não foram alteradas no diabetes; 2) ocorreu tendência de osteoporose alveolar, em vários graus e de maneira não específica; 3) no diabetes severo, a osteoporose alveolar foi acompanhada por alterações semelhantes em outros ossos do sistema esquelético; 4) em alguns casos individuais de diabetes, o osso alveolar não apresentou alterações significativas; 5) no diabetes, a hiperglicemia e mudanças pancreáticas não estão associadas com a tendência óssea de osteoporose; e, 6) não foram notadas mudanças patológicas na membrana periodontal ou cemento, associadas com o diabetes.

ROSE (1973), em um estudo com macacos rhesus diabéticos aloxânicos, verificou que após 2 anos de elevado nível de glicose no sangue, os animais apresentaram mudanças periodontais significantes, principalmente no tecido ósseo.

REUTERVING, HAGG e GUSTAFSON (1986), estudaram cárie, doença periodontal e desgaste oclusal em 38 ratos com diabetes, após 1 e 12 meses da injeção de aloxana, verificando que após 1 mês da indução da doença, os ratos diabéticos apresentaram menos placa bacteriana na região gengival do primeiro molar mandibular, em relação aos normais; entretanto demonstraram maior quantidade de leucócitos no epitélio juncional. Não foram observadas também maior incidência de impacção de material estranho e de lesões de cárie nos diabéticos. Nos ratos mantidos diabéticos durante 12 meses, esses autores observaram no entanto, maior grau de alterações dos tecidos periodontais, maior impacção interdental de material estranho, presença de lesões de cárie na região interdental, perda óssea alveolar e maior desgaste oclusal em relação aos animais normais.

RENOLD, BURR e STAUFFACHER (1971), descreveram a importância do diabetes espontâneo em animais, e sua relevância nos estudos de diabetes humana. STAHL (1968), estudando 22 camundongos diabéticos autossômicos recessivos, relatou que o estado metabólico do periodonto no diabetes, sem irritantes locais, não induz à doença inflamatória periodontal. ELGENEIDY e cols. (1974), não encontraram diferenças estatisticamente significativas na gravidade da inflamação no periodonto de camundongos mutantes diabéticos, apesar de relatarem que nos diabéticos, algumas regiões apresentavam-se com alterações mais severas quando

comparadas aos camundongos normais. ANAPOLLE, ALBRIGTH e CRAFT (1977), estudando tecidos gengivais de hamsters diabéticos autossômicos recessivos, verificaram em microscopia eletrônica, espessamento da membrana basal nos pequenos vasos sanguíneos gengivais dos animais diabéticos em relação aos normais.

RAMAMURTHY, ZEBROWSKI e GOLUB (1972), estudando o metabolismo do colágeno em ratos, observaram que o diabetes aloxânico inibe a síntese e aumenta a degradação de colágeno, em todo o organismo do animal, incluindo o colágeno dos tecidos gengivais, quando comparado a animais não diabéticos. Os mesmos autores em 1974, estudando as alterações no colágeno gengival de ratos diabéticos aloxânicos, e ratos diabéticos aloxânicos tratados com insulina, observaram que as mudanças na taxa de síntese inibida e a taxa de degradação aumentada nos ratos diabéticos, são revertidas ao normal quando os mesmos passam a ser tratados com doses diárias de insulina.

RAMAMURTHY e cols. (1973), demonstraram um decréscimo na quantidade de osso, nos tecidos periodontais de ratos diabéticos aloxânicos, em relação aos normais, porém o osso presente estava normalmente calcificado. As alterações na quantidade de osso mandibular nos ratos diabéticos, refletem a degradação acelerada de colágeno, devida em parte, pelo aumento nos níveis teciduais de colagenase encontrada nestes animais (RAMAMURTHY e GOLUB, 1978 e 1983). Por outro lado,

JOHNSON (1985), demonstrou que o diabetes experimental produzido pela estreptozotocina, não intensificou a perda óssea alveolar em camundongos susceptíveis, possivelmente porque a condição de diabético foi estabelecida subsequentemente ao início da reabsorção óssea alveolar.

GOLUB, GARANT e RAMAMURTHY (1977), estudando inflamação crônica induzida pela injeção de complexos antígeno-anticorpo em tecidos periodontais, observaram que ratos diabéticos apresentaram alterações morfológicas similares aos normais, exceto macrófagos contendo maior quantidade de material fagocitado e fibroblastos menores e menos diferenciados. O conteúdo de colágeno nos tecidos gengivais não estava alterado nos diabéticos, fato ao qual os autores sugerem três possibilidades: 1) que os fibroblastos dos ratos diabéticos apresentam diminuição no ritmo de remodelação de colágeno durante a inflamação; 2) que as células inflamatórias responsáveis pela reabsorção de colágeno, diminuíram a sua atividade devido ao diabetes; 3) que o colágeno do animal diabético apresenta-se mais resistente às enzimas degradativas produzidas em maior quantidade durante a inflamação.

SCHNEIR, RAMAMURTHY e GOLUB (1984), observaram que a degradação de colágeno recentemente sintetizado (provavelmente procolágeno) na gengiva do incisivo de ratos, era três vezes maior que na pele. Concomitantemente, a formação de moléculas de colágeno permanente na gengiva,

apresentou-se mais lenta que na pele. A taxa de degradação de colágeno permanente na gengiva, demonstrou-se apenas levemente aumentada em ratos com diabetes induzida pela estreptozotocina, enquanto que na pele a degradação foi dramaticamente aumentada durante o estágio de diabetes.

RAMAMURTHY e cols. (1985), demonstraram que o interrelacionamento entre a inflamação induzida experimentalmente e o decréscimo na atividade das enzimas (prolil e lisil-hidroxilase) que participam na síntese de colágeno, alteram significativamente a gravidade da doença periodontal em ratos diabéticos aloxânicos, devido a presença de fibroblastos alterados e do decréscimo na síntese de colágeno durante a inflamação gengival. SCHNEIR e cols. (1986), demonstraram também, diminuição na taxa de produção de colágeno "in vivo" de 65%, em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, em relação a animais normais.

Alterações em glândulas salivares também são citadas em animais diabéticos induzidos por aloxana (NICOLAU, ROSA e FAVA DE MORAES, 1969) e pela estreptozotocina (ANDERSON e GARRET, 1986), mas é pouco provável que interfiram indiretamente nos tecidos periodontais.

Efeitos de cicatrização mais demorados, em tecidos gengivais de ratos diabéticos aloxânicos, são demonstrados por GLICKMAM, SMULOW e MOREAU (1967), os quais observaram inibição na atividade fibroblástica, na formação de colágeno

e na neoformação óssea nos diabéticos. RAMAMURTHY e cols. (1979), descreveram diminuição ao nível de 50% na resposta leucocitária (neutrófilos, monócitos e linfócitos) de ratos diabéticos aloxânicos, após cirurgia no sulco gengival em relação á animais normais. HANAM, SINGLETON e RUDEK (1983), afirmaram que a insulina produz efeitos na atividade dos fibroblastos, na proliferação celular e aumento na ação quimiotática e fagocitária de leucócitos polimorfonucleares, em camundongos.

MC NAMARA e cols. (1982), demonstraram alterações na microbiota crevicular, com acúmulo marcadamente aumentado de placa bacteriana em ratos diabéticos aloxânicos em relação aos normais, afirmando serem tais alterações da microbiota provavelmente resultantes de modificações na região sulcular, como o aumento na quantidade de substrato (glicose e urêia) e o decréscimo de oxigênio. Os autores observaram ainda, que as mudanças microbiológicas antecederam á formação de bolsa periodontal.

NASCIMENTO e cols. (1985), atribuíram ao estado diabético, em ratos injetados com aloxana, a condição de modificador da evolução da lesão periodontal, de acordo com os efeitos que possa ter na flora do sulco gengival, fisiologia da gengiva e do tecido ósseo, metabolismo do colágeno, reação inflamatória e processo de regeneração.

São inúmeras as descrições de manifestações bucais no diabetes melitus em humanos, mas os dados são muito

contraditórios. SHEPPARD (1942), descreve que as características da inflamação periodontal crônica são similares em indivíduos diabéticos e normais, assim como a taxa de reabsorção óssea. HOVE e STALLARD (1970), afirmaram também que a severidade da doença periodontal foi semelhante clinicamente em pacientes diabéticos e normais, e que a gravidade da doença aumenta com a idade em ambos os grupos. ERVASTI e cols. (1985), estudando 50 pacientes adultos diabéticos, e 53 adultos normais, não encontraram diferenças significativas nos tecidos periodontais dos dois grupos.

Por outro lado, BELTING, HINIKER e DUMMETT (1964), relatam que a severidade da doença periodontal aumentou significativamente em 78 pacientes hospitalizados com diabetes melito, em relação a 79 pacientes hospitalizados por outras causas, e que, a idade aumenta significativamente a gravidade da doença em ambos os grupos. CDHEN e cols. (1970), em estudo longitudinal, com observações de pacientes durante 2 anos, demonstraram em 21 pacientes diabéticos, maior e significante envolvimento dos tecidos gengivais em relação a 18 pacientes controle.

2.4. EFEITOS DO DIABETES NA PERMEABILIDADE VASCULAR.

Vários autores têm relatado respostas vasculares reduzidas e diminuição da reação inflamatória no diabetes experimental. GOTH e cols. (1957), demonstraram que ratos diabéticos aloxânicos não apresentaram edema característico e nível elevado de histamina no plasma após injeção endovenosa de dextrano ou clara de ovo. Prê-tratamento com insulina restaurou a habilidade em produzir edema, e o tratamento com insulina em ratos normais intensificou tal habilidade. ADAMKIEWICZ e ADAMKIEWICZ (1959), afirmaram que a inflamação "anafilactóide" produzida pelo dextrano em ratos, não ocorre durante o diabetes aloxânico, sendo entretanto restabelecida pela administração de insulina. BERALDO, DIAS DA SILVA e LEMOS FERNANDES (1962), observaram que ratos diabéticos aloxânicos não apresentaram reação na pele ao dextrano, evidenciada pelo azul de Evans, quando comparados aos controles.

Segundo GARCIA LEME e cols. (1973), o desenvolvimento de edema em patas de rato após injeção local de dextrano, carragenina ou sulfato de celulose foi marcadamente reduzido quando os animais apresentavam-se diabéticos após a injeção de aloxana ou quando submetidos a pancreatectomia. Tal inibição foi revertida pela prévia injeção de insulina nos animais. Os autores sugeriram que a insulina tem importante papel no controle da permeabilidade vascular, e

consequentemente no controle da resposta inflamatória, sendo sua ação explicada por duas situações: uma ação direta sobre os vasos da microcirculação através de mecanismo desconhecido; ou uma exacerbação dos efeitos de glicocorticóides, com conseqüente efeito anti-inflamatório.

Através de análises ultraestruturais em vasos subdérmicos submetidos à ação da histamina, GARCIA LEME e cols. (1974), revelaram que aberturas endoteliais são facilmente encontradas em ratos normais, entretanto são raramente observadas em animais diabéticos. Os autores sugerem uma direta ação pró-inflamatória da insulina, podendo a mesma reverter a diminuição de aberturas endoteliais encontradas nos animais diabéticos e também exercer controle sobre a permeabilidade vascular. Os autores afirmaram ainda que, a integridade da resposta microcirculatória a estímulos, depende pelo menos parcialmente da insulina, e que sua deficiência produz mudanças funcionais, diminuindo portanto as respostas vasculares e inflamatórias.

Segundo HOVE e STALLARD (1970), o diabetes produz doenças vasculares em pequenos e grandes vasos. Mudanças características são encontradas em arteríolas, capilares e vénulas de diferentes tecidos e órgãos. A maioria destas situações consiste de marcante proliferação das células endoteliais, frequente obliteração do lúmen do vaso, alargamento e reduplicação da membrana basal e presença de

material PAS positivo periendotelialmente. O aumento da espessura das paredes dos vasos pode produzir redução na velocidade de circulação sanguínea, com decréscimo na difusão de oxigênio e acúmulo de metabólitos.

Segundo GANDA (1980), a aterosclerose ocorre mais cedo e com maior gravidade na população de diabéticos que na de não-diabéticos. A maior predisposição a doenças macrovasculares, segundo tais autores é devido a tres fatores não encontrados em pacientes normais: 1) presença associada de microangiopatia, 2) hiperglicemia e suas consequências diretas ou indiretas, e, 3) fatores hormonais que alteram o estado metabólico e bioquímico, como causa ou efeito da diabetes.

CAMPBELL (1971), relatou que as alterações nas paredes e membrana basal dos pequenos vasos sanguíneos de outras regiões do organismo, também foram encontradas nos tecidos gengivais de ratos diabéticos. Exames em microscopia de luz revelaram a presença de fibrilas PAS-positivas, desorientação e proliferação de células e marcado espessamento da parede dos vasos gengivais. Exames em microscopia eletrônica, revelaram aumento estatisticamente significativo na espessura da membrana basal dos vasos gengivais nos animais diabéticos. ANAPOLLE, ALBRIGHT e CRAFT (1977), observaram resultados semelhantes em pequenos vasos gengivais e da mucosa da

bochecha, em hamster chinês com diabetes autossômica recessiva.

RUSSEL (1966), estudando 37 pacientes diabéticos diagnosticados a menos de 10 anos, observou em cortes histológicos de biópsias de gengiva marginal, alterações vasculares em 38% dos casos, enquanto que para os pacientes normais, não foram encontradas alterações. KEENE (1969) e LISTGARTEN e cols. (1974), também observaram alterações nos vasos gengivais de pacientes diabéticos, com significativo aumento de espessura da membrana basal.

FRANTZIS, REEVE e BROWN (1971), estudaram a ultraestrutura da membrana basal de pacientes diabéticos e observaram as seguintes alterações em relação a pacientes não diabéticos: aumento da espessura, evidências de produção de fibras de colágeno e deposição de material semelhante ao da membrana basal periendotelialmente. Os autores sugerem que o espessamento observado nos diabéticos, pode impedir a difusão de oxigênio e eliminação de catabólitos, resultando em distúrbios fisiológicos, com aumento da severidade da doença periodontal.

2.5. PERMEABILIDADE DOS VASOS GENGIVAIS.

A arquitetura da vascularização dos tecidos periodontais de molares de rato, foi descrita por WEEKES e SIMS (1986a,b), através da perfusão com metil-metacrilato e observações em microscópio eletrônico de varredura. Segundo estes autores, o plexo crevicular consiste de dois grandes arranjos; o primeiro, representado por uma rede plana imediatamente subjacente ao epitélio juncional, estende-se até a crista da gengiva livre, logo abaixo do epitélio de revestimento. O suprimento arterial deste plexo deriva-se dos tecidos gengivais, porém, a drenagem venosa dirige-se ao plexo venoso do ligamento periodontal. O segundo maior arranjo, consiste em uma série de vasos entrelaçados formando "alças", situados pouco abaixo do primeiro plexo, nas faces linguais e vestibulares. Estes vasos entrelaçados exibem arranjo mais complexo nas faces interproximais (papilas), ocupando a maior parte do volume dos tecidos desta região. A rede plana (primeiro arranjo), na região da papila transforma-se em fina faixa imediatamente adjacente ao tecido epitelial. Tais vasos entrelaçados formando "alças", consistem predominantemente de vénulas pós-capilares, apesar de muitos capilares estarem presentes. ALMEIDA e BÖHM (1978), também descreveram vasos entrelaçados formando "alças", com diâmetros de 10 a 25 μ m na vascularização da região crevicular da gengiva.

EGELBERG (1966a,b), não classificou os vasos descritos por ele na região crevicular da gengiva em cães, mas sugeriu que são principalmente capilares e vénulas.

Várias técnicas são usadas para estudo do aumento de permeabilidade vascular, sendo o carvão coloidal adequado para observações morfológicas. Desde o trabalho original de MAJNO e PALADE (1961) e MAJNO, PALADE e SCHOEFL (1961), o carvão coloidal tem sido frequentemente usado como elemento marcador para estudos de permeabilidade vascular a nível de microscopia de luz e ultraestrutural. O acúmulo de carvão, na parede dos vasos, está associado com o aumento da filtração de plasma proveniente de vasos de áreas inflamadas, com as partículas de carvão sendo encontrados entre as células endoteliais, entre as células endoteliais e pericitos, e entre as células endoteliais e a membrana basal adjacente (COTRAN, SUTER e MAJNO, 1967). Os depósitos de carvão ocorrem devido a separação transitória das junções intercelulares das células endoteliais, permitindo a passagem do plasma e partículas de carvão coloidal através destes espaços. Como as partículas de carvão não se difundem rapidamente pelo conjuntivo adjacente, os vasos ficam com suas paredes "tatuadas" de carvão por longos períodos (MAJNO, PALADE e SCHOEFL, 1961; MAJNO e PALADE, 1961; SCHOEFL, 1962).

THEILADE, EGELBERG e ATTSTRÖM (1971), estudando gengiva de cães, marcada com carvão coloidal em microscopia

eletrônica, observaram que depósitos de carvão foram encontrados no citoplasma das células endoteliais e de pericitos, e em leucócitos intra e extravasculares. As áreas entre as células de revestimento da parede dos vasos e entre estas células e a membrana basal não revelaram partículas de carvão. A partir destes resultados, os autores afirmaram que os vasos da gengiva cronicamente inflamada não exibiram aumento da permeabilidade vascular, e que, quando comparados à gengiva normal, a cronicamente inflamada caracterizava-se por aumento da migração de leucócitos e aumento de carvão no citoplasma das células endoteliais e pericitos.

ALMEIDA e BÖHN (1978), através de injeções endovenosas de carvão coloidal em ratos, descreveram que todos os vasos abaixo de regiões não queratinizadas do epitélio da gengiva apresentam aumento da permeabilidade vascular. Foram nestas regiões não queratinizadas que WEEKS e SIMS (1986a) descreveram a localização de vasos entrelaçados formando "alças".

Substâncias de diferentes pesos moleculares como peroxidase, dextrano, lipopolissacarídeos e partículas de carvão, quando aplicadas no sulco gengival, são capazes de atravessar o tecido epitelial pelos espaços intercelulares e atingir o conjuntivo subjacente (TOLO, 1971; MC DOUGALL, 1971; SCHWARTZ, STINSON e PARKER, 1972; ALFANO, CHASENS e MASI, 1977). Por outro lado, proteínas plasmáticas,

leucócitos , imunoglobulinas e componentes do complemento, constantemente passam dos vasos gengivais para o sulco formando o fluido gengival (BRILL e KRASSE, 1958; BRILL e BRÖNNESTAM, 1960; BRANDTZAEG ,1965; HOLMBERG e KILLANDER, 1971; ATTSTRÖM e cols., 1975; CHALLACOMBE e cols., 1978; TOLLEFSEN e SALTVEDT, 1980).

A doença periodontal, de natureza inflamatória crônica, apresenta constante exudação de proteínas, provenientes do plasma, para a região do sulco gengival. As estruturas que formam a junção dento-gengival permitem a passagem de substâncias do tecido conjuntivo para o sulco gengival e vice-versa, ocorrendo uma permeabilidade bidirecional. Esta dupla permeabilidade do tecido gengival faz com que substâncias oriundas do fluido sulcular, como o complemento, possam interagir com os componentes da placa, e os produtos ativos resultantes poderão atravessar novamente a barreira epitelial e darem continuidade à reação inflamatória periodontal.

Os vasos que permitem a passagem destas macromoléculas, devem apresentar um aumento de permeabilidade, podendo-se inferir que, na gengiva, os vasos que apresentam aumento da permeabilidade são os responsáveis pela formação do fluido gengival. Os primeiros estudos destas alterações vasculares na gengiva foram feitos em cães por EGELBERG (1966a, b, c, d,e), o qual observou que na gengiva clinicamente normal do cão não há aumento de permeabilidade vascular e formação de

fluido gengival. O mesmo autor, também verificou que a permeabilidade dos vasos na inflamação periodontal crônica, está levemente aumentada em relação ao normal, e que estes vasos são mais sensíveis a estímulos mecânicos ou à aplicação de histamina que os localizados nas áreas normais. A afirmação de EGELBERG, "a permeabilidade dos vasos da gengiva clinicamente normal não difere da de outros tecidos normais", no caso do rato é apenas válida nas áreas queratinizadas, já que os vasos subjacentes ao epitélio juncional ficam facilmente marcados com carvão coloidal (ALMEIDA e BÖHM, 1978).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Animais.

Foram utilizados 140 ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*) adultos, machos, pesando de 150 a 300 gramas, provenientes do Biotêrio da Disciplina de Patologia da FOP-UNICAMP, alimentados com ração "Labina" (Purina) e água "ad libitum". Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle com 25 e grupo experimental com 115 ratos.

3.2. Diabetes Experimental.

Os animais do grupo experimental, após período de jejum de 24 horas, foram injetados intraperitonealmente com 150 mg/Kg de peso corporal de aloxana (Monohidrato de aloxana - Carlos Erba). Para diminuir a hipoglicemia nas primeiras 12 horas após a injeção de aloxana, foram adicionados 15% de sacarose à água de beber dos animais durante este período.

A glicosúria foi medida em dias alternados, e sem período de jejum, até o décimo sexto dia após a injeção da aloxana, usando-se indicador "Glico-Fita" (Lilly). No décimo sétimo dia, os animais foram deixados em jejum durante doze horas, e a glicosúria medida novamente. Nos animais com glicosúria de uma (+ , 0,1%, que equivale a aproximadamente 100 mg % de glicose na urina) a quatro

cruzes (++++ , 2%, que equivale a aproximadamente 2 g ou mais % de glicose na urina), foi medida a glicemia com auxílio do aparelho Glico-Teste (Exata), usando-se sangue obtido da cauda dos animais.

Foram selecionados 25 ratos com glicemia acima de 250 mg%, e os demais desprezados. Deve-se ressaltar que alguns ratos morreram após a injeção de aloxana, enquanto que outros não atingiram hiperglicemia de 250 mg%. Os animais do grupo controle foram também submetidos à medidas glicêmicas, segundo a mesma técnica, e apresentaram valores normais. Os animais controles e diabéticos foram pesados periodicamente durante toda a fase experimental.

3.3. Contagem total e diferencial de leucócitos.

A contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos, foi feita em 10 ratos normais e 10 diabéticos. A contagem inicial foi realizada antes da injeção de aloxana e a final após 18 dias, utilizando-se animais com glicemia acima de 250mg%.

Após anestesia com éter etílico e incisão na cauda, a primeira gota de sangue foi desprezada, e a seguir, coletadas quantidades suficientes para obtenção de duas lâminas de esfregaço sanguíneo, usadas para a contagem diferencial. A seguir, com auxílio de micropipeta, 10 μ l de sangue foram diluídos em 200 μ l de líquido de Turk. A

contagem total de leucócitos foi feita com auxílio de câmara de Neubauer, e objetiva de 40 vezes. As coletas foram feitas sempre entre as 9:00 e 10:00 horas.

A contagem diferencial foi feita em esfregaços de sangue corados pela técnica de Leishman, usando-se objetiva de imersão (aumento final de 1000 vezes), sendo contadas pelo menos 100 células em cada lâmina.

3.4. Permeabilidade Vascular na Pele.

A permeabilidade vascular na derme, foi estudada em 10 ratos normais e 10 diabéticos, usados também nos experimentos descritos a seguir. Após anestesia por inalação de éter etílico e tricotomia do dorso, foram marcados seis pontos na pele, distantes entre si de 2 a 3 cm, sendo 3 no lado direito e 3 no esquerdo. A seguir os animais foram injetados endovenosamente com 25 mg/Kg de peso corporal de azul de Evans. Imediatamente após, injetou-se intradermicamente nos seis pontos marcados, 20 µg de histamina diluídos em 0,1 ml de solução fisiológica de Ringer. Quarenta minutos após a injeção de histamina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, suas peles dissecadas e distendidas em placas de cortiça. O acúmulo de azul de Evans foi quantificado arbitrariamente, por três observadores, com unidades de zero a quatro de acordo com o diâmetro da área alterada e intensidade de azul

do corante. As médias obtidas entre os observadores foram utilizadas para cálculos da média geral e desvio padrão.

3.5. Permeabilidade Vascular no Músculo Cremâster.

Para os experimentos de permeabilidade vascular no músculo cremâster foram utilizados 25 ratos normais e 25 diabéticos. Os animais foram anestesiados com éter etílico, e injetados endovenosamente, através da veia lateral da cauda, com 0,1 ml por 100 gramas de peso corporal de carvão coloidal (Faber-Castell; Johann Faber S/A).

Imediatamente após, nas superfícies dos músculos cremâster direito e esquerdo, foram injetados 0,1 ml de solução de Ringer contendo 15 µg de histamina. Experimentos preliminares mostraram que a injeção de 0,1 ml de solução de Ringer, provoca aumento de permeabilidade vascular desprezível em relação ao efeito da histamina.

Quarenta minutos após, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os músculos cremâster distendidos sobre placas de cortiça, fixados durante 24 horas em formol a 10%. O material foi desidratado em álcool, diafanizado em xilol e montado em lâminas com bálsamo do Canadá, sem coloração prévia.

A quantificação foi feita atribuindo-se unidades arbitrárias de zero a quatro de acordo com a intensidade de

marcação dos vasos do cremâster, sendo a leitura feita por três observadores.

3.6. Permeabilidade Vascular nos Vasos Gengivais.

A quantificação da permeabilidade vascular nos vasos gengivais foi feita simultaneamente ao estudo dos vasos do músculo cremâster, usando-se os mesmos animais (25 normais e 25 diabéticos).

Os animais foram injetados com carvão coloidal, como descrito anteriormente e após quarenta minutos, a mandíbula e a maxila retirados e fixados em formol a 10 % por 48 horas.

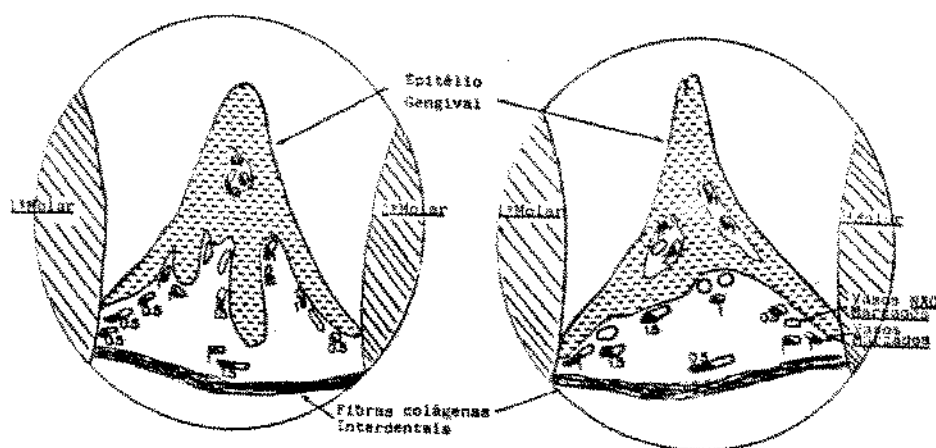
Após descalcificação em ácido tricloroacético a 6% durante 48 horas, os dentes molares da hemimandíbula direita e do maxilar direito foram removidos dos respectivos alvéolos para facilitar a observação das regiões gengivais marcadas pelo carvão coloidal. Estas observações macroscópicas foram feitas com o auxílio de lupa Estereoscópica Zeiss.

As hemimandíbulas e maxilares esquerdos foram descalcificados em ácido tricloroacético por 72 horas e incluídos em parafina no sentido mesio-distal. Os cortes de 5 μ m, corados pela Hematoxilina-Eosina e pelo Azul de Toluidina pH 4.0, foram montados em bálsamo do Canadá.

Usando-se os cortes corados com HE, todos os segmentos vasculares presentes nas papilas interdetais da mandíbula e maxila (papilas entre o primeiro e segundo molares e entre o segundo e terceiro molares), foram desenhados usando-se microscópio Zeiss de câmara clara equipado com objetiva de 40 e ocular de 10 vezes. A intensidade de marcação com carvão de cada vaso, foi quantificada com unidades arbitrárias de zero a quatro, usando-se objetiva de imersão e cortes corados com azul de Toluidina. A figura 1, ilustra o método de quantificação.

3.7. Análise Estatística.

A análise estatística foi realizada através do teste "t" de Student, segundo Vieira (1983), para comparação entre duas médias, sendo fixado o nível de significância em 5% ($p < 0,05$) e 1% ($p < 0,01$).



RATO NORMAL

RATO DIABÉTICO

FIGURA 1 - Desenhos de papilas interdetais de ratos normais e diabéticos após a injeção de 0,1 ml por 100 g de peso corporal de carvão coloidal. Foram representados os vasos marcados com carvão coloidal e os vasos não marcados. Nos vasos marcados a intensidade de acúmulo de carvão coloidal foi quantificada com unidades arbitrárias de 0 a 4.

RATO NORMAL

Total de segmentos

de vasos = 18

Vasos marcados = 15

Vasos não marcados = 3

Quantificação = 16

Média de quantificação

por vaso = 0,8889

RATO DIABÉTICO

Total de segmentos

de vasos = 17

Vasos Marcados = 12

Vasos não marcados = 5

Quantificação = 13

Média de quantificação

por vaso = 0,7647

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. Diabetes experimental.

No décimo-oitavo dia após a injeção intraperitoneal do monohidrato de aloxana, os ratos apresentavam-se abatidos, com visível perda de peso, pelagem comprometida e gaiolas úmidas. A tabela 1 mostra os resultados da glicemia e glicosúria dos ratos usados nos experimentos para estudo da permeabilidade vascular. Os animais diabéticos apresentaram glicosúria positiva e medidas glicêmicas acima de 250 mg%.

TABELA 1 - Médias e desvio-padrão da glicosúria e glicemia de ratos normais e diabéticos, antes (inicial), e 18 dias após a injeção de aloxana (final).

RATOS	GLICOSÚRIA		GLICEMIA (mg%)	
		Sem Jejum	6 h. jejum	12 h. jejum
NORMAIS (n=25)				
Inicial	zero	114,14±13,73	111,10± 9,71	101,68± 9,78
Final	zero	118,84± 5,79	109,85± 8,71	102,31± 7,75
DIABÉTICOS (n=25)				
Inicial	zero	115,48± 6,08	110,31± 8,71	103,45± 5,43
Final	2,40±0,69	355,90±46,70	311,10±41,61	279,30±36,64

Os animais diabéticos apresentaram perda significativa de peso ($p > 0,01$) em relação ao peso inicial (Tabela 2), enquanto que ratos normais tiveram aumento de peso ($p > 0,01$).

TABELA 2 - Médias e desvio-padrão do peso corporal em gramas de ratos normais e diabéticos, antes (inicial), e 18 dias após a injeção de aloxana (final).

RATOS	INICIAL	FINAL
NORMAIS (n=25)	228,86±87,67	264,66±61,16 *
DIABÉTICOS (n=25)	206,86±45,73	184,00±52,93 *

*Diferença significativa ao nível de 0,1%.

4.2. Contagem total e diferencial de leucócitos.

As contagens totais de leucócitos circulantes de ratos diabéticos, imediatamente antes e 18 dias após a injeção de aloxana não apresentaram variações significantes, o mesmo ocorrendo com os animais controles. As contagens diferenciais realizadas nos mesmos animais também não demonstraram diferenças significativas, conforme pode ser observado na tabela 3.

RATOS	Contagem total de leucócitos. (células/mm ³)	Contagem diferencial de Leucócitos.			
		LINFÓCITOS	MONÓCITOS	NEUTRÓFILOS	EOSINÓFILOS
NORMAIS					
Inicial	13730 ⁺ 3211	10709 ⁺ 878 (78 %)	687 ⁺ 453 (5 %)	2197 ⁺ 983 (16 %)	14 ⁺ 15 (1 %)
Final	14340 ⁺ 4215	10468 ⁺ 1097 (73 %)	860 ⁺ 359 (6 %)	2595 ⁺ 1145 (18 %)	43 ⁺ 37 (3 %)
DIABÉTICOS					
Inicial*	14595 ⁺ 2770	10092 ⁺ 841 (76 %)	1022 ⁺ 395 (7 %)	2335 ⁺ 795 (16 %)	15 ⁺ 16 (1 %)
Final*	14425 ⁺ 5284	9809 ⁺ 1310 (68 %)	721 ⁺ 391 (5 %)	3606 ⁺ 1331 (25 %)	29 ⁺ 32 (2 %)

*Taxa glicêmica acima de 250 mg%.

TABELA 3 - Médias e desvio padrão de contagens totais e diferenciais de leucócitos circulantes de ratos normais e diabéticos, antes (inicial), e 18 dias após a injeção de aloxana (final).

4.3. Permeabilidade Vascular na Pele.

A injeção intradérmica de 20 µg de histamina nos ratos diabéticos aloxânicos, provocou menor acúmulo de azul de Evans (figura 2), com diferença significativa ao nível de 0,1% em relação aos animais normais. O acúmulo de azul de Evans, quantificado por três examinadores, em 6 pontos no dorso dos animais, com unidades arbitrárias de 0 a 4, demonstraram valores médios de 3,0 para os normais e 1,21 para os diabéticos, como pode ser observado na tabela 4.

TABELA 4 - Médias e desvio padrão da intensidade de acúmulo de azul de Evans, em 6 pontos na pele de ratos normais e diabéticos, após a injeção intradérmica de 20 µg de histamina (unidades arbitrárias de 0 a 4).

PONTO NÚMERO	RATOS NORMAIS (n=10)	RATOS DIABÉTICOS (n=10)
1	3,40 ± 0,69	1,15 ± 0,47
2	3,00 ± 0,81	1,05 ± 0,36
3	2,90 ± 0,87	1,55 ± 0,76
4	2,90 ± 1,10	1,20 ± 0,63
5	3,00 ± 0,66	1,50 ± 0,70
6	2,80 ± 0,78	1,05 ± 0,36
MÉDIA	3,00 ± 0,21	1,25 ± 0,22*

* Diferença significativa ao nível de 0,1%.

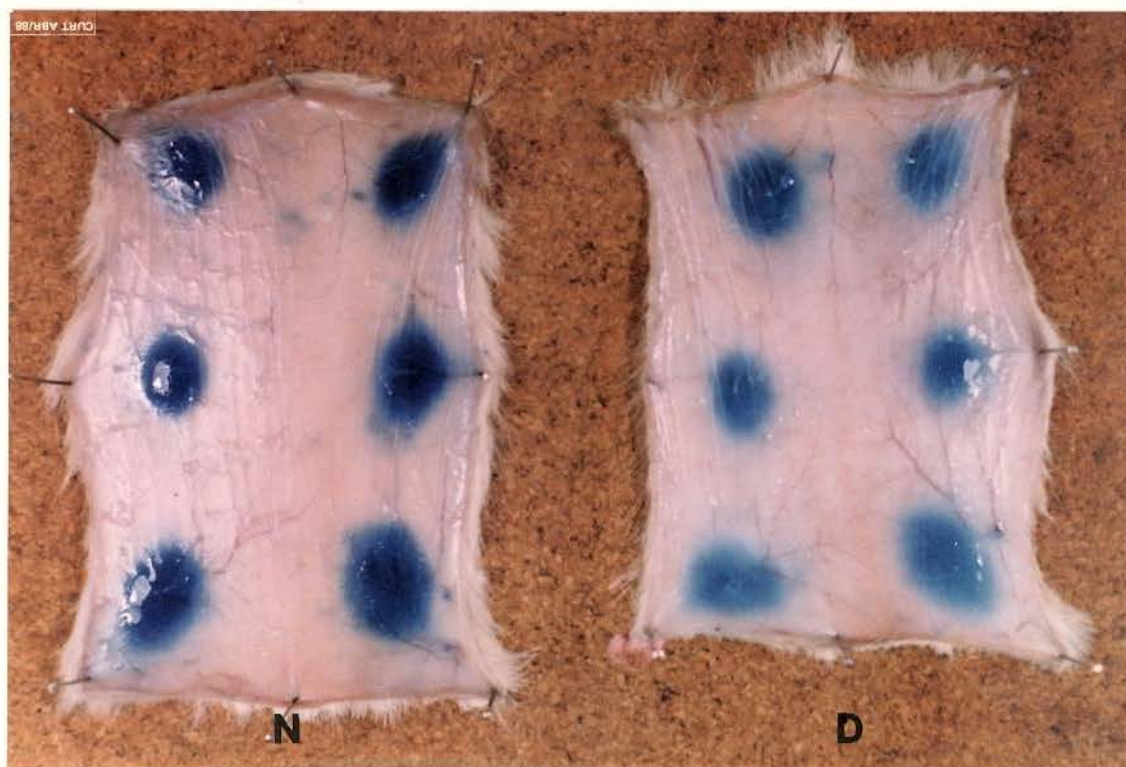


FIGURA 2 - Acúmulo de azul de Evans na pele de ratos normais (N) e diabéticos (D), 40 minutos após a injeção intradérmica de 20 µg de histamina. Nos animais diabéticos observa-se que a marcação foi menos intensa.

4.4. Permeabilidade Vascular no Músculo Cremàster.

O acúmulo de carvão coloidal nos vasos do músculo cremàster de ratos diabéticos e normais, quantificados com unidades arbitrárias de 0 a 4, apresentaram valores médios de 3,12 para os normais e 1,20 para os diabéticos, com diferença significativa ao nível de 0,1%. Os dados encontram-se expressos na tabela 5, e a figura 3 ilustra tal diferença.

TABELA 5 - Médias e desvio-padrão da intensidade de marcação com carvão coloidal, nos vasos do músculo cremàster de ratos normais e diabéticos, após injeção local de 15 µg de histamina (unidades arbitrárias de 0 a 4).

RATOS	INTENSIDADE DE CARVÃO COLOIDAL
NORMAIS (n=25)	3,12 ± 0,82
DIABÉTICOS (n=25)	1,20 ± 0,69 *

*Diferença significativa ao nível de 0,1%.

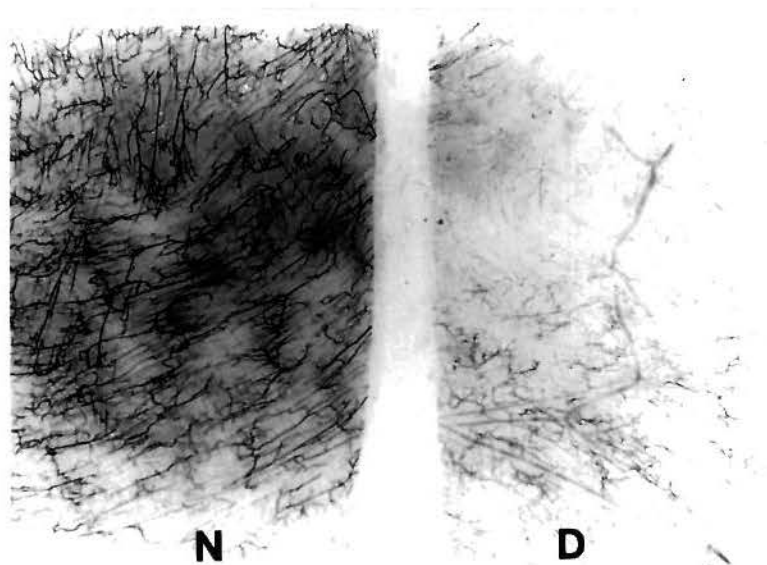


FIGURA 3 - Marcação com carvão coloidal nos vasos do cremâster de ratos normais (N) e diabéticos (D), 40 minutos após a injeção de 15 μ g de histamina. Nos animais diabéticos observa-se que a marcação foi menos intensa. Aumento de 2,5 vezes.

4.5. Permeabilidade Vascular nos Vasos Gengivais.

Macroscopicamente, após a extração dos dentes molares, a marcação da gengiva com carvão coloidal pode ser observada na região interna do sulco gengival, pouco abaixo da margem gengival. Em aumentos maiores observa-se que os vasos marcados com carvão, correm paralelamente à superfície gengival, formando uma linha escura contínua, da qual partem ramos perpendiculares que não atingem a margem gengival. Cada segmento perpendicular está formado por dois ramos vasculares que formam alças, separadas uma das outras por pequeno espaço, sem partículas de carvão. Os animais diabéticos mostraram marcação menos intensa que os controles (2,16 e 2,38 respectivamente), entretanto estes valores não foram significativos, como pode ser observado na tabela 6 e figura 4. Também não foram encontradas variações entre a intensidade de marcação com carvão na gengiva dos dentes superiores em relação aos inferiores. Para a análise microscópica, foram usadas as papilas interdentais entre o primeiro e segundo molares e as papilas entre os segundos e terceiros molares, tanto dos maxilares quanto das mandíbulas dos ratos normais e diabéticos (Figura 5). Os aspectos morfológicos das papilas interdentais dos ratos normais e diabéticos foram semelhantes, sendo recobertas por tecido epitelial não queratinizado composto de 2-3 camadas de células. O tecido conjuntivo subjacente apresenta células

inflamatórias, principalmente neutrófilos, que também infiltram o tecido epitelial juncional. Em alguns casos o cemento apresentava-se exposto na sua extremidade cervical e abaixo das fibras interdentais não foram encontradas células inflamatórias.

TABELA 6 - Médias e desvio-padrão da intensidade de marcação com carvão coloidal, nos vasos da gengiva de ratos normais e diabéticos (unidades arbitrárias de 0 a 4).

RATOS	INTENSIDADE DE ACUMULO DE CARVÃO COLOIDAL		
	Mandíbula	Maxila	Total
NORMAIS (n=25)	2,40±0,83	2,36±0,84	2,38±0,81
DIABÉTICOS (n=25)	2,07±1,07	2,17±1,07	2,16±1,03

A contagem do número total de segmentos de vasos nas papilas interdentais, assim como dos vasos marcados com carvão e vasos não marcados pode ser observado na tabela 7. Os dados desta tabela demonstram que a intensidade de marcação foi semelhante quer considerando as diferenças entre as papilas da maxila ou mandíbula, entre as papilas superiores e inferiores, assim como entre os grupos de ratos normais e diabéticos.

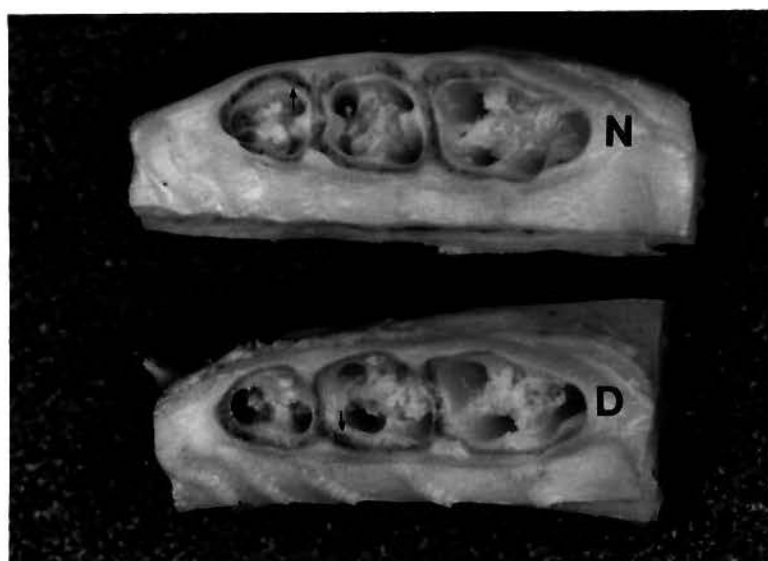


FIGURA 4 - Marcação com carvão coloidal nos vasos da gengiva de ratos normais (N) e diabéticos (D). Observa-se uma linha escura de marcação na face interna da gengiva, semelhante para os animais normais e para os diabéticos. Aumento de 2,5 X.

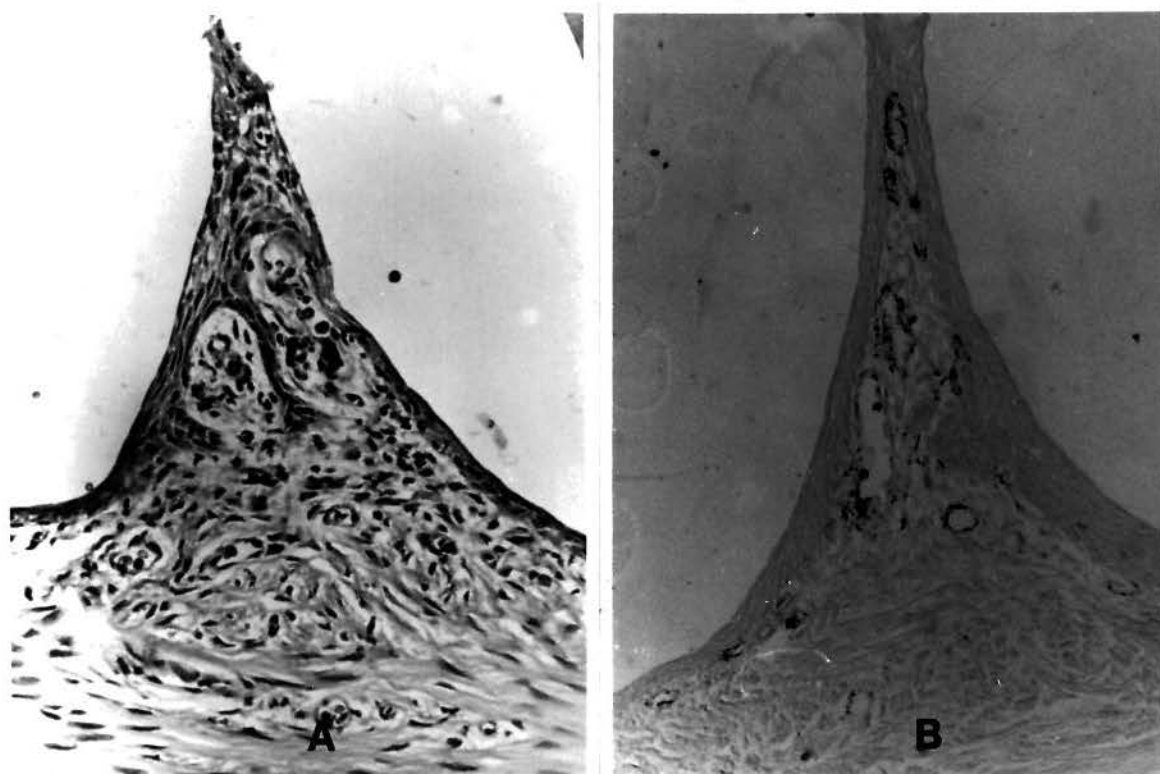


FIGURA 5 - Cortes histológicos de papila interdental de rato normal, no sentido mèsio-distal, corado pela Hematoxilina-Eosina (A) e pelo Azul de Toluidina (B) Nos cortes corados pelo Azul de Toluidina observa-se segmentos vasculares marcados com carvão coloidal. Aumento de 160 vezes.

RATOS	Total de Vasos	Vasos Marcados	Vasos Não-Marcados	Intensidade de Marcação
NORMAIS (n=25)				
Papila 1	21,36 ⁺ 6,38	16,53 ⁺ 6,01	4,80 ⁺ 3,18	1,08 ⁺ 0,35
Papila 2	21,00 ⁺ 4,58	15,83 ⁺ 4,29	5,17 ⁺ 2,61	1,39 ⁺ 0,35
Papila 3	19,12 ⁺ 5,19	13,21 ⁺ 5,09	5,91 ⁺ 4,31	1,19 ⁺ 0,35
Papila 4	22,64 ⁺ 1,45	15,39 ⁺ 6,52	6,68 ⁺ 3,75	1,13 ⁺ 0,44
Média	21,03 ⁺ 1,45	15,39 ⁺ 1,49	5,64 ⁺ 0,83	1,20 ⁺ 0,14
DIABÉTICOS (n=25)				
Papila 1	22,04 ⁺ 5,38	16,71 ⁺ 5,57	5,33 ⁺ 2,73	1,37 ⁺ 0,53
Papila 2	22,42 ⁺ 4,38	17,68 ⁺ 2,65	4,74 ⁺ 2,54	1,15 ⁺ 0,42
Papila 3	19,88 ⁺ 3,71	15,12 ⁺ 3,16	4,76 ⁺ 3,33	1,24 ⁺ 0,41
Papila 4	21,35 ⁺ 4,71	15,96 ⁺ 6,32	5,39 ⁺ 2,99	1,32 ⁺ 0,10
Média	21,42 ⁺ 1,12	16,37 ⁺ 1,09	5,05 ⁺ 0,35	1,27 ⁺ 0,14

Papila 1 - entre o primeiro e segundo molares inferiores esquerdos.
Papila 2 - entre o segundo e terceiro molares inferiores esquerdos.
Papila 3 - entre o primeiro e segundo molares superiores esquerdos.
Papila 4 - entre o segundo e terceiro molares superiores esquerdos.

TABELA 7 - Médias e desvio-padrão do número de segmentos vasculares marcados e não-marcados com carvão coloidal, e intensidade de marcação (unidades arbitrárias de 0 a 4), em papilas interdentais de molares de ratos normais e diabéticos.

DISCUSSIO

5. DISCUSSÃO.

A utilização de monohidrato de aloxana para a obtenção de ratos diabéticos, forneceu resultados satisfatórios e condizentes aos inúmeros trabalhos da literatura (GOMORI e GOLDNER, 1943; LAZARROW e PALAY, 1946; GLIKMAN, SMULOW e MOREAU, 1967; RAMAMURTHY, ZEBROWSKI e GOLUB, 1972 e 1974; RAMAMURTHY e cols., 1973; MC NAMARA e cols., 1982; ZIMMERMAN e cols., 1984; RAMAMURTHY e cols., 1985). Os animais utilizados neste trabalho apresentaram níveis de glicemia acima de 250 mg%, após 12 horas de jejum, o que está de acordo com trabalhos de GOMORI e GOLDNER (1943), KASS e WAISBREN (1945), LAZARROW e PALAY (1946), GARCIA LEME e cols. (1973 e 1974); glicosúria acima de 100 mg%, de acordo com ADAMKIEWICZ e ADAMKIEWICZ (1959), BERALDO, DIAS DA SILVA e LEMOS FERNANDES (1962), BISSADA, SCHAFFER e LAZARROW (1966), RAMAMURTHY, ZEBROWSKI e GOLUB, (1972); e mais de 10% de perda de peso corporal (LAZARROW e PALAY, 1946; GARCIA LEME e cols., 1973). Apesar de atualmente, muitos autores estarem utilizando-se da estreptozotocina, para obtenção de quadro diabético em ratos (DULIN e SORET, 1977; HANAN, SINGLETON e RUDEK, 1983; SCHNEIR, RAMAMURTHY e GOLUB, 1984; JOHNSON, 1985; ANDERSON e GARRET, 1986; SCHNEIR e cols., 1986), o diabetes aloxânico continua a ser um modelo útil para o estudo dos efeitos do diabetes no organismo. Segundo GANDA, ROSSINI e LIKE (1976), os efeitos da aloxana

e da estreptozotocina em ratos são similares, apesar dos mecanismos de ação destas drogas serem diferentes. Por outro lado, já em 1947, BAILEY e LECOMPTE consideravam que o diabetes aloxânico em animais, apresenta sintomas clínicos semelhantes daqueles encontrados no diabetes humano.

Com relação a determinação da glicemia, estudos preliminares (Apêndice) demonstraram que os resultados obtidos com o aparelho Glico-Teste, com sangue total, foram semelhantes aos obtidos pelo método da orto-toluidina, com soro ou plasma. Estudos preliminares demonstraram também não haver diferenças significativas, quando da utilização do plasma ou do soro, pelo método da orto-toluidina. Devido a estes fatos, somados a facilidade e rapidez do método, foram considerados os resultados obtidos apenas com o aparelho Glico-Teste.

Os dados obtidos, na contagem total e diferencial de leucócitos circulantes nos ratos diabéticos, não apresentaram variações na quantidade total de leucócitos, porém apresentaram diminuição na porcentagem de linfócitos e monócitos, e aumento na porcentagem de neutrófilos, porém tais diferenças não foram considerados estatisticamente significativas. Tais dados, acham-se semelhantes aos descritos por CRESKOFF, FITZ-HUGH e FARRIS (1971) e BERTÃO (1985). Mesmo tomando-se o cuidado de procurar realizar as coletas sempre nos mesmos horários (entre as 9:00 e 10:00

horas), as contagens leucocitárias nos ratos apresentaram variações, mesmo nos animais normais.

Os resultados deste trabalho, mostram que em ratos diabéticos, a permeabilidade vascular na pele é menor em relação a ratos normais. Tais resultados confirmam pesquisas de BOTH e cols. (1957), que demonstraram que ratos diabéticos aloxânicos apresentavam-se marcadamente resistentes à liberação de histamina e produção de edema induzido por dextrano e clara de ovo; entretanto, pré-tratamento com insulina não somente removia tal resistência, como tornava ratos normais mais susceptíveis à ação destes compostos. Estudos semelhantes realizados por ADAMKIEWICZ e ADAMKIEWICZ (1959), demonstraram que ratos diabéticos aloxânicos não reagiam ao dextrano, mas quando sua diabetes era aliviada pela terapia simultânea com insulina, os animais passavam a responder à injeção de dextrano com reação inflamatória "anafilactóide", de intensidade normal, sugerindo estes autores, que a inibição da inflamação durante o diabetes aloxânico foi devido principalmente a falta da insulina.

BERALDO, DIAS DA SILVA e LEMOS FERNANDES (1962), também obtiveram resultados semelhantes, relatando que o dextrano não produz aumento da permeabilidade vascular na pele de ratos diabéticos, porém que a reatividade à histamina e ao 48/80 nestes animais permanecem inalterados. Com o uso do azul de Evans, os autores demonstraram que o aumento da

permeabilidade capilar, pode ser detectado antes do aparecimento do edema, quando da injeção do dextrano. Esses autores demonstraram ainda, que quando o dextrano é injetado junto com a glicose em animais normais, não ocorre reação, sugerindo que a glicose possui capacidade de bloquear a liberação de histamina pelos mastócitos. SCHER e LAWRENCE (1971), no entanto, encontraram resultados discordantes dos deste trabalho, e dos demais autores citados. Esses autores relataram que ratos diabéticos aloxânicos caracterizam-se por : transudação mais rápida de azul de broncofenol para os espaços intradérmicos, quando injetados endovenosamente com o corante; perda mais rápida de proteínas do soro, marcadas radiativamente, do compartimento vascular; e, edema periférico acentuado após injeção intravenosa de dextrano. Esses resultados não concordam com GARCIA LEME e cols. (1973), que demonstraram que o edema induzido em pata de ratos pelo dextrano, carragenina e sulfato de celulose foi acentuadamente inibido em ratos diabéticos, e que a administração de insulina reverte tal inibição. Estes autores observaram também, com a utilização da técnica do azul de Evans, que a permeabilidade vascular cutânea nos animais diabéticos, apresentou-se diminuída em relação aos normais, quando de injeções equipotentes de doses de histamina, serotonina ou bradicinina, o que concorda com os resultados obtidos neste trabalho. GARCIA LEME e cols. (1974), demonstraram em microscopia eletrônica, que vasos da

pele de ratos normais apresentavam-se congestionados e com inúmeras junções endoteliais abertas após a injeção de histamina, enquanto que, ratos diabéticos apresentavam-se com as junções endoteliais fechadas, mesmo após a injeção do mediador. Os autores sugerem que a integridade das respostas microcirculatórias, dependem, pelo menos parcialmente, da presença da insulina, sendo que sua ausência, produz mudanças funcionais nas reações vasculares da inflamação.

Como se sabe, a metabolização da glicose provoca liberação de energia, e esta é responsável pela cinética de abertura das junções endoteliais. Esse fato poderia explicar a redução na formação de edema e o menor extravazamento proteico observado pela técnica do azul de Evans em ratos diabéticos.

Estudos da permeabilidade vascular, por outro lado, tem sido realizados por vários autores (BENACERRAF, MC CLUSKEY e PATRAS, 1959; MAJNO e PALADE, 1961; MAJNO, PALADE e SCHOEFL, 1961), utilizando-se da injeção endovenosa de carvão coloidal, sendo que no músculo cremàster, devido a características próprias do tecido, tal técnica apresentou-se satisfatória para observações de alterações vasculares e de permeabilidade, quando o músculo é submetido a estímulos químicos ou físicos (SCHOEFL, 1962; GRANT, 1964; MAJNO, GILMORE e LEVENTHAL, 1967a e b; ALMEIDA, BÖHM e BONTA, 1976).

Os resultados deste trabalho, utilizando-se de marcação dos vasos no músculo cremâster, em ratos normais e diabéticos com carvão coloidal, mostraram que os diabéticos apresentavam muito menor alteração na permeabilidade vascular, quando da injeção de quantidades padronizadas de histamina. Este fenômeno pode ser explicado pelas mesmas alterações produzidas pela diabetes nos vasos da pele.

Para verificarmos, se os vasos da gengiva de ratos diabéticos aloxânicos, apresentavam-se com permeabilidade vascular alterada em relação a ratos normais, utilizamo-nos da técnica descrita por ALMEIDA e BÖHM (1978). Esses autores, com o uso do carvão coloidal, demonstraram em ratos normais, que o tecido conjuntivo situado abaixo do epitélio queratinizado apresentava-se normal, mas aquele subjacente ao epitélio não queratinizado, apresentava-se com algum grau de inflamação crônica, e os vasos da área exibiam aumento da permeabilidade vascular. No microscópio eletrônico, os vasos das áreas inflamadas, apresentavam segundo ALMEIDA e BÖHM, muitas junções endoteliais abertas e também pseudofenestrações e vesículas endoplasmáticas repletas de carvão.

Vasos marcados com partículas de carvão, refletem a passagem de proteínas do plasma, e a quantidade de fluido gengival formado aumenta progressivamente durante o desenvolvimento de gengivite (EGELBERG e ATTSTRÖM, 1973). Em ratos, os vasos gengivais são prontamente marcados, mas

THEILADE, EGELBERG e ATTSTRÖM (1971), usando marcação em gengiva de cães, relatou que os vasos que não foram irritados mecanicamente, não demonstraram sinais de aumento de permeabilidade vascular. Esta diferença é interessante do ponto de vista da maior susceptibilidade de cães à doença periodontal que ratos.

CAMPBELL (1971) demonstrou que microangiopatias, encontradas nas paredes e membrana basal de vasos sanguíneos, em várias outras regiões do organismo, foram também encontradas nos tecidos gengivais. Estudos efetuados por HOVE e STALLARD (1970), em 28 pacientes diabéticos e 16 não diabéticos, revelaram mudanças vasculares em 71% dos pacientes diabéticos e em apenas 14% dos não diabéticos, sendo que tais mudanças ocorrem principalmente nos capilares, pequenas arteríolas e vénulas, e são provavelmente devidas a: 1) aumento da espessura da membrana basal; 2) presença de fendas na membrana basal; 3) entumescimento do epitélio vascular; e 4) aumento na intensidade de coloração da membrana basal (positividade ao PAS).

Entretanto, através das observações morfológicas a nível de microscopia de luz feitas neste trabalho, não foram observadas diferenças entre as estruturas periodontais de ratos normais e diabéticos, resultados que estão de acordo com GLIKMAN (1946), que estudou diabetes aloxânico em ratos, e de STAHL (1968) que utilizou-se de camundongos que

apresentavam diabetes transmitido por gene autossômico dominante. Por outro lado, ROSE (1973), verificou alterações ósseas no periodonto, após 2 anos de hiperglicemia produzida por aloxana em macacos rhesus. Em pesquisas com ratos albinos GLIKMAN, SMULOW e MOREAU (1967), demonstraram que a diabetes retarda a cicatrização seguida de cirurgia no periodonto, pois inibe a atividade fibroblástica, formação de colágeno, desenvolvimento de osteoblastos e neoformação óssea. Efeitos mais marcantes, ocorrem segundo estes autores, em animais com diabetes há mais tempo. Neste trabalho, os animais foram utilizados 18 dias após a injeção da aloxana, de tal forma que o curto período de tempo talvez não tenha permitido que ocorressem alterações nos vasos gengivais. Em animais mantidos com diabetes durante períodos maiores, ou ratos com diabetes espontânea é possível que alterações na permeabilidade dos vasos gengivais possam ser observadas. Como a insulina é essencial para o metabolismo do colágeno (RAMAMURTHY, ZEBROWSKY e GOLUB, 1972), e o "turn over" é bastante alto no periodonto (CARNEIRO e FAVA DE MORAES, 1965), é provável que a longo prazo ocorram modificações na morfologia gengival, envolvendo também as estruturas vasculares.

GOES e cols. (1983), estudando permeabilidade vascular nos vasos dento-gengivais, durante o desenvolvimento da gengiva em ratos, descreveram vasos alterados que apresentavam estruturas semelhantes a de

vênulas, tanto em animais jovens como adultos. Segundo MAJNO, PALADE e SCHOEFL (1961), em inflamações agudas típicas, os vasos principalmente envolvidos são vênulas, mas, contrariamente ao que acontece na gengiva, o aumento da permeabilidade vascular em outros tecidos é transitória. Nos vasos gengivais, o extravasamento de proteínas é contínuo e persistente, sugerindo que os vasos possuam características diferentes.

Além disso, segundo BØES e cols. (1983), concomitantemente com o aumento da permeabilidade vascular, células inflamatórias podem ser observadas no tecido conjuntivo e epitélio juncional, sugerindo que os vasos alterados são parte do desenvolvimento da reação inflamatória. Os mediadores químicos das alterações vasculares nos vasos gengivais até o presente são desconhecidos, mas estando ou não relacionados com os componentes da placa, tais mediadores devem agir continuamente sobre as junções inter-endoteliais.

Os resultados obtidos neste trabalho, através da utilização de carvão coloidal, demonstraram que os vasos gengivais de ratos normais e diabéticos comportaram-se de maneira semelhante, não sendo visualizadas e quantificadas as diferenças, como as obtidas nos vasos da pele e do cremâster. Se houver diferenças na permeabilidade vascular dos vasos gengivais de ratos diabéticos em relação a normais, as mesmas são discretas e não puderam ser

detectadas devido a sensibilidade do método. Utilizamos apenas a técnica do carvão coloidal, para estudo da permeabilidade vascular dos vasos gengivais, sendo que nesta técnica, apesar de permitir exames morfológicos adequados, permite apenas quantificação subjetiva. Entretanto, com o mesmo método, no músculo cremâster não houve dúvidas quanto a intensa diminuição do extravasamento de proteínas plasmáticas. Outros métodos frequentemente usados para a quantificação da permeabilidade vascular, como o azul de Evans e a albumina radioativa não são adequados para a gengiva. O tecido gengival tem a peculiaridade de permitir a saída das proteínas plasmáticas para o sulco gengival, e desta forma não retém no tecido parte do material a ser quantificado. Por outro lado, em humanos e em animais de maior porte, pode-se quantificar de maneira adequada a permeabilidade vascular indiretamente, através de coleta do fluido gengival, o mesmo não ocorrendo no rato.

Respostas vasculares reduzidas e reação inflamatória menos intensa a irritantes químicos, têm sido descritas nos vasos gengivais no diabetes (GOTH e cols. 1957; BERALDO, DIAS DA SILVA and LEMOS FERNANDES, 1962). Outros autores, como FRANTZIS, REEVE e BROWN (1971), relataram que capilares gengivais apresentavam-se com sua membrana basal mais espessa em pacientes diabéticos com doença periodontal, do que em pacientes não diabéticos. Esses autores sugeriram, que o aumento da gravidade da doença periodontal, pode ser

devido, em parte, a microangiopatias notadas nos capilares de diabéticos. Devido a estas alterações patológicas, a difusão de oxigênio e eliminação de produtos catabólitos nos tecidos gengivais, segundo FRANTZIS, REEVE e BROWN (1971), podem estar prejudicados, resultando portanto em desequilíbrio metabólico, o qual por sua vez, poderia levar a diminuição na resistência dos tecidos de pacientes diabéticos e influenciar no início, progressão e desenvolvimento da doença periodontal. Entretanto, os resultados deste trabalho, demonstraram que os vasos gengivais de ratos diabéticos e normais, apresentaram permeabilidade vascular aumentada constantemente, confirmando os achados de GOES et al (1983).

Outros autores, também relataram alterações nos vasos gengivais de pacientes e animais diabéticos, principalmente referindo-se ao espessamento da membrana basal (KEENE, 1964; RUSSEL, 1966; LISTGARTEN e cols., 1974; ANAPOLLE, ALBRIGHT e CRAFT, 1977). MC MULLEN e cols. (1967), estudaram 56 pacientes em três diferentes estágios da diabetes: pré-diabetes (pacientes com predisposição familiar a doença), diabetes químico (pacientes com intolerância a glicose, porém sem sintomas) e diabetes com sintomas. Os autores encontraram alterações características nos vasos gengivais dos três tipos de diabéticos.

ELGENEIDY e cols. (1974), não observaram diferenças significativas na severidade da inflamação

periodontal, entre o grupo de camundongos diabéticos recessivos e normais, apesar de que no grupo diabético, algumas áreas apresentavam-se com alterações muito mais marcantes. Esses autores, também não verificaram alterações vasculares significativas nos animais diabéticos, em observações no microscópio eletrônico, entretanto observaram significante relação entre a quantidade de glicose nos tecidos e o grau de inflamação crônica. Existe correlação, entre a quantidade de glicose nos tecidos e seu nível no sangue, em animais diabéticos, porém não nos normais. Ocorre aumento na produção de glicose nos tecidos com inflamação crônica, nos camundongos diabéticos e controles, entretanto enquanto nos normais a glicose é metabolizada, nos diabéticos ela não o é, e o excesso passa para o sangue.

De acordo com WEDMORE e WILLIAMS (1981), os neutrófilos que migram durante as fases agudas da inflamação estão associados ao aumento da permeabilidade vascular, podendo secretar substâncias capazes de contrair células endoteliais. Como no diabetes há redução na migração de neutrófilos e macrófagos (MOWAT e BAUM, 1971; SEIFERT, JONES e DIXIT, 1982), este também seria um possível mecanismo que atuaria na permeabilidade vascular de ratos diabéticos. HANAM, SINGLETON e RUDEK (1983), afirmaram que a insulina produz efeitos sobre a atividade quimiotática e fagocitária de leucócitos polimorfonucleares.

RAMAMURTHY e cols. (1979), estudando a atividade quimiotática de leucócitos, e a resposta de neutrófilos e linfócitos, no sulco gengival durante a cicatrização após cirurgia, em ratos normais e diabéticos aloxânicos, observaram um dia após a cirurgia, que os animais normais apresentavam aumento marcante no número de leucócitos, principalmente neutrófilos, no sulco gengival, passando este número a decrescer até chegar ao número inicial (pré-operatório). Os diabéticos entretanto, apresentaram resposta 50% menos intensa, e retorno mais lento aos níveis pré-operatórios. A resposta alterada dos leucócitos no sulco de ratos diabéticos, devem refletir diminuição na atividade quimiotática, como pode ser observado em leucócitos peritoneais, e espessamento da membrana basal dos vasos, que podem impedir a migração celular. Segundo estes autores, os mecanismos responsáveis pela diminuição da quimiotaxia nos diabéticos não são conhecidos, porém os autores sugerem as seguintes possibilidades: 1) várias das principais enzimas glicolíticas responsáveis pela liberação de energia para a quimiotaxia são reguladas pela insulina. A diminuição da quantidade de energia, parece interferir também com a fagocitose; 2) níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos (AMP e GMP), podem regular a atividade quimiotática. Tais nucleotídeos controlam a quimiotaxia, promovendo o arranjo e desarranjo de microtúbulos. GMP estimula este processo e AMP age como inibidor. A insulina

parece exercer ação sobre estes nucleotídeos; 3) interferências no complemento em derivar substâncias quimiotáticas; e, 4) alterações nos receptores de membrana dos leucócitos.

No entanto, estudos efetuados por GÖES (1981), ilustram que os vasos subjacentes ao epitélio juncional são fontes de polimorfonucleares e fluido gengival, demonstrando que logo após a erupção dos dentes, concomitantemente com a migração de polimorfonucleares, ocorre o aumento da permeabilidade vascular nos vasos gengivais, o que permite a marcação com carvão coloidal, e que segundo resultados deste trabalho, ocorre tanto nos ratos normais como nos diabéticos.

Nossos resultados demonstraram que os ratos diabéticos aloxânicos, apresentaram diminuição na permeabilidade vascular da derme e do tecido muscular, o que não ocorreu nos tecidos gengivais. Como os vasos gengivais de animais normais apresentaram-se marcados com carvão, esperava-se que com diminuição da permeabilidade vascular devido ao diabetes, e a conseqüente falta de insulina, os vasos dos ratos diabéticos apresentassem marcação menos intensa, o que entretanto não ocorreu. Isto leva-nos a sugerir que os vasos gengivais de ratos apresentam diferenças quanto ao seu comportamento, frente a permeabilidade vascular, em relação a vasos de outras regiões do organismo destes animais. Parece-nos que os vasos gengivais apresentam suas aberturas

endoteliais sob o controle de outros mediadores químicos, que não do grupo histamínico, os quais por sua vez não estariam na dependência da insulina.

CONCLUDES

6. CONCLUSÕES.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, as seguintes conclusões foram obtidas:

1. Ratos diabéticos aloxânicos demonstraram permeabilidade vascular marcadamente diminuída, nos vasos da pele e do músculo cremâster, quando comparados a animais normais.

2. Ratos normais e diabéticos aloxânicos apresentaram permeabilidade vascular semelhante nos vasos da gengiva envolvidos na formação do fluido gengival.

3. As conclusões 1 e 2 permitem inferir que existem diferenças no comportamento dos vasos gengivais, com relação a permeabilidade vascular, quando comparados aos vasos da pele e do músculo cremâster em ratos diabéticos aloxânicos.

RESUMO

SUMMARY

7. RESUMO.

Os resultados deste trabalho confirmaram que a permeabilidade vascular na pele e músculo cremâster está diminuída nos ratos diabéticos. Por outro lado, nos mesmos animais, não se observou alterações da permeabilidade vascular dos vasos gengivais envolvidos na formação do fluido gengival. Estes resultados indicam que a insulina não participa efetivamente na permeabilidade dos vasos gengivais, como ocorre em outros tecidos.

8. SUMMARY.

Diabetic rats showed a decreased vascular permeability of the skin and cremaster muscle vessels. On the other hand, the same animals did not present similar alterations in the vessels involved in the formation of gingival fluid. These results suggest that insulin does not play an important role in the permeability of the gingival vessels.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ADAMKIEWICZ, V.W.; ADAMKIEWICZ, L.M. Alloxan diabetes and dextran "anaphylactoid" inflammation. Am.J.Physiol., 197:377-79, 1959.
- ALFAND, M.C.; CHASENS, A.I.; MASI, C.W.. Autoradiographic study of the penetration of radiolabelled dextrans and inulin through non-keratinised oral mucosa "in vitro". J.periodont.Res., 12:368-77, 1977.
- ALMEIDA, O.P.; BÖHM, G.M.; BONTA, I.L. Morphological study of lesions induced by snake venoms (*Naja naja* and *Agkistrodon piscivorus*) in the lung and cremaster vessels of rats. J.Path., 121:169-76, 1976.
- ALMEIDA, O.P.; BÖHM, G.M. Vascular permeability in the rat gingiva. A model of vessel response in chronic inflammation. J.Path., 127:27-34, 1978.
- ANAPOLLE, S.E.; ALBRIGTH, J.T.; CRAFT, F.O. Microvascular lesions of gingival and cheek pouch tissue in the diabetic chinese hamster. J.Periodontol., 48:341-45, 1977.
- ANDERSON, L.C.; GARRETT, J.R. Lipid accumulation in the major salivary glands of streptozotocin-diabetic rats. Archs.oral Biol., 31:469-75, 1986.

- ANDERSON, W.A.D.; SCOTTI, T.M. Sinopse de patologia. 8.ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica Ltda, 1976. 1031p.
- ATTSTRÖM, R.; LAURELL, A.B.; LAHSSON, U.; SJÖHOLM, A. Complement factors in gingival crevice material from healthy and inflamed gingiva in humans. J.periodont.Res., 10: 19-27, 1975.
- BAILEY, C.C.; LECOMPTE, P. Clinical implications of alloxan diabetes. Med.Clin.North Am., 31:427-33, 1947.
- BANERJEE, S. Effect of certain substances on the prevention of diabetogenic action of alloxan. Science, 106:128-30, 1947.
- BELTING, C.M.; HINIKER, J.J.; DUMMETT, C.O. Influence of diabetes mellitus on the severity of periodontal disease. J.Periodontol., 35:476-80, 1964.
- BENACERRAF, B.; MC CLUSKEY, R.T.; PATRAS, D. Localization of colloidal substances in vascular endothelium. A mechanism of tissue damage. I.Factors causing the pathologic deposition of colloidal carbon. Am.J.Path., 35:75-91, 1959.
- BENNETT, L.L.; KONEFF, A.A. (1946) apud F.D.W. LUKENS in "Alloxan diabetes." p. 316 - Physiol.Rev., 28:304-30, 1948.

- BERALDO, W.T.; DIAS DA SILVA, W.; LEMOS FERNANDES, A.O.
Inhibitory effects of carbohydrates on histamine release
and mast cell disruption by dextran.
Brit.J.Pharmacol., 19:405-13, 1962.
- BERNICK, S.M.; COHEN, D.W.; BAKER, L.; LASTER, L. Dental
disease in children with diabetes mellitus.
J.Periodontol., 46:241-5, 1975.
- BERTÃO, J.M. Presença de eosinófilos na doença periodontal
de ratos. Piracicaba-SP, 1985. 40p. <Tese de mestrado -
Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP>.
- BLUMENTHAL, H.T. The relation of microangiopathies to
arteriosclerosis, with special reference to diabetes.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 149:834, 1968.
- BISSADA, N.F.; SCHAFFER, E.M.; LAZAROW, A. Effect of
alloxan diabetes and local irritating factors on the
periodontal structures of the rat. Periodontics,
4:233-40, 1966.
- BRANDTZAEG, P. Immunochemical comparison of proteins in
human gingival pocket fluid, serum and saliva.
Archs.oral Biol., 10:795-803, 1965.
- BRILL, N.; KRASSE, B. The passage of tissue fluid into the
clinically healthy gingival pocket. Acta odont.Scand.,
16:233-45, 1958.

- BRILL, N.; BRÖNNESTAM, R. Immuno-electrophoretic study of tissue fluid from gingival pockets. Acta odont.Scand., 18:95-100, 1960.
- CAMPBELL, M.J.A. A light and electron microscope study of blood vessels from the gingival tissues of non-diabetic and diabetic patients. Aust.dent.J., 16:235-239, 1971.
- CARNEIRO, J.; FAVA DE MORAES, F. Radioautographic visualization of the collagen metabolism in the periodontal tissues of the mouse. Arch.oral Biol., 10:833-48, 1965.
- CHALLACOMBE, S.J.; RUSSEL, M.W.; HAWKES, J.E.; BERGMEIER, L.A.; LEHNER, T. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. Immunology, 35:923-31, 1978.
- CHESLER, A.; TISLDWITZ, R. Effect of alloxan diabetes on the growing rat. Science, 101:468, 1945.
- COHEN, D.W.; FRIEDMAN, L.A.; SHAPIRO, J.; KYLE, G.C.; FRANKLIN, S. Diabetes mellitus and periodontal disease: two-year longitudinal observations. - part I. J.Periodont., 41:709-12, 1970.
- COTRAN, R.S.; SUTER, E.R.; MAJNO, G. The use of colloidal carbon as a tracer for vascular injury. A review. Vascular Diseases, 4:107-27, 1967.

- COVIAN, F.G. Aspectos fisiológicos de la diabetes experimental por aloxana. Cadern.Cient.,1: 263-90, 1946.
- CRESKOFF, A.J.; FITTZ-HUCH, Jr., T.; FARRIS, E.J. Hematology of the rat - Methods and standards. In: FARRIS, E.J.; GRIFFITH, J.Q. - The rat in laboratory investigation. New York, Hafner Publishing Company, 1971. cap.14. p. 411-2.
- DUFF, G.L.; STARR, H. Experimental alloxan diabetes in hooded rats. Proc.Soc.exp.Biol.Med.,57:280-2, 1944.
- DULIN, W.E.; SORET, M.G. Chemically and hormonally induced diabetes. In: The diabetic pancreas. Eds. B.W.Volk, K.F.Wellmann. New York and London, Plenum Press, 1977. p.425-65.
- DUNN, J.S.; KIRKPATRICK, J.; MACLETCHIE, N.G.B.; TELFER, S.V. Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. J. Path.Bact.,55:245-57, 1943.
- EGELBERG, J. The blood vessels of the dento-gingival junction. J.periodont.Res.,1:163-74, 1966a.
- EGELBERG, J. Permeability of the dento-gingival blood vessels. I. Application of the vascular labelling method and gingival fluid measurements. J.periodont.Res. , 1:180-91, 1966b.

EGELBERG, J. Permeability of the dento-gingival blood vessels. II. Clinically health gingivae. J.periodont.Res., 1:276-86, 1966c.

EGELBERG, J. Permeability of the dento-gingival blood vessels. III. Chronically inflamed gingivae. J.periodont.Res., 1:287-96, 1966d.

EGELBERG, J. Permeability of the dento-gingival blood vessels. IV. Effect of histamine on vessels in clinically healthy and chronically inflamed gingivae. J.periodont.Res., 1:297-302, 1966e.

EGELBERG, J.; ATTSTROM, R. Comparison between orifice and intracrevicular methods of sampling gingival fluid. J.periodont.Res., 8:384-8, 1973.

ELGENEIDY, A.K.; STALLARD, R.E.; FILLIDS, L.C.; GOLDMAN, H.M. Periodontal and vascular alterations: their relationship to the changes in tissue glucose and glycogen in diabetic mice. J.Periodont., 45:394-401, 1974.

ERVASTI, T.; KNUUTTILA, M.; POHJAMO, L.; HAUKIPURO, K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. J.Periodont., 56:154-57, 1985.

- FRANTZIS, T.G.; REEVE, C.M.; BROWN, Jr., A.L. The ultrastructure of capillary basement membranes in the attached gingiva of diabetic and nondiabetic patients with periodontal disease. J.Periodont., 42:406-11, 1971.
- GANDA, O.P.; ROSSINI, A.A.; LIKE, A.A. Studies on streptozotocin diabetes. Diabetes, 25:595-603, 1976.
- GANDA, O.P. Pathogenesis of macrovascular disease in the human diabetic. A review. Diabetes, 29:931-42, 1980.
- GARCIA-LEME, J.; HAMAMURA, L.; MIGLIORINI, R.H.; LEITE, M.P. Influence of diabetes upon the inflammatory response of the rat. A pharmacological analysis. Eur.J.Pharm., 23:74-81, 1973.
- GARCIA-LEME, J.; BÖHN, G.M.; MIGLIORINI, R.H.; DE SOUZA, M.Z.A. Possible participation of insulin in the control of vascular permeability. Eur.J.Pharm., 29:298-306, 1974.
- GLICKMAN, I. The periodontal structures in experimental diabetes. N.Y.J.dent., 16:226-51, 1946.
- GLICKMAN, I.; SMULOW, J.B.; MOREAU, J. Postsurgical periodontal healing in alloxan diabetes. J.Periodont., 38:93-9, 1967.

GOES, M.F. O desenvolvimento do processo inflamatório no tecido gengival do rato. Piracicaba-SP, 1981. 67p. (Tese de mestrado - Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP).

GOES, M.F.; ALMEIDA, D.P.; BOZZO, L.; VIZIOLI, M.R. Vascular changes during the development of the rat gingiva. J.periodont.Res.,18:402-11, 1983.

GOLDNER, M.G.; GOMORI, G. Alloxan diabetes in the dog. Endocrinology,33:297-308, 1943.

GOLUB, L.M.; GARANT, P.R.; RAMAMURTHY, N.S. Inflammatory changes in gingival collagen in the alloxan-diabetic rat. J.periodont.Res.,12:402-18, 1977.

GOMORI, G.; GOLDNER, M.G. Production of diabetes mellitus in rats with alloxan. Proc.Soc.exp.Biol.,54:287-90, 1943.

GOTH, A.; NASH, W.L.; NAGLER, M.; HOLMAN, J. Inhibition of histamine release in experimental diabetes. Am.J.Physiol.,191:25-8, 1957.

GRANT, R.T. Direct observations of skeletal muscle blood vessels (rat cremaster). J.Physiol.(Lond) 172: 123-37, 1964.

- HANAM, S.R.; SINGLETON, C.E.; RUDEK, W. The effect of topical insulin on infected cutaneous ulcerations in diabetic and nondiabetic mice. J.of Foot Surg.,22: 298-301, 1983.
- HOLMBERG, K.; KILLANDER, J. Quantitative determination of immunoglobuline (IgG, IgA and IgM) and identification of IgA type in the gingival fluid. J.periodont.Res.,6: 1-8, 1971.
- HOUSE, E.L. A histological study of the pancreas, liver and kidney both during and after recovery from alloxan diabetes. Endocrinology,62:189-200, 1958.
- HOVE, K.A.; STALLARD, R.E. Diabetes and the periodontal patient. J.Periodont.,41:713-8, 1970.
- JACOBS, H.R. Hypoglycemic action of alloxan. Proc.Soc.exp.Biol.Med.,37:407-9, 1937.
- JOHNSON, R.B. Effects of experimental diabetes mellitus on alveolar bone loss in periodontal disease-susceptible mice. J.periodont.Res.,20:307-16, 1985.
- KASS, E.H.; WAISBREN, B.A. A method for consistent induction of chronic hyperglycemia with alloxan. Proc.Soc.exp.Biol.Med.,60:303-6, 1945.

- KEENE, Jr., J.J. Observations of small blood vessels in human nondiabetic and diabetic gingiva. J.dent.Res., 48:967, 1969.
- KENDALL, F.E.; MEYER, W.; LEWIS, L.; VICTOR, J. Alloxan diabetes in rabbits. Production of hypercholesterolemia, hyperlipemia and adrenal cortical lesions. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 60:190-5, 1945.
- LACKEY, R.W.; BUNDE, C.A.; GILL, A.J.; HARRIS, L.C. Glycogen in alloxan-treated rats. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 57:191-4, 1944.
- LAZAROW, A.; PALAY, S.L. The production and course of alloxan diabetes in the rat. J.Lab.Clin.Med., 31:1004-15, 1946.
- LAZAROW, A. Spontaneous recovery from alloxan diabetes in the rat. Diabetes, 1:363-72, 1952.
- LEWIS, L.A.; MOSES, J.; SCHNEIDER, R.W. Plasma proteins. II. Alteration in alloxan diabetic rabbits especially in relation to ocular damage. Am.J.Med.Sci., 213: 214-20, 1947.
- LISTGARTEN, M.A; RICKER, Jr., F.H.; LASTER, L.; SHAPIRO, J.; COHEN, D.W. Vascular basement lamina thickness in the normal and inflamed gingiva of diabetics and non-diabetics. J.periodont., 45:676-84, 1974.

- LUKENS, F.D.W. Alloxan diabetes. Physiol.Rev.,28: 304-30, 1948.
- MAJNO, G.; PALADE, G.E. Studies on inflammation. I.The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. J.Biophys.Biochem.Cytol.,11:571-604, 1961.
- MAJNO, G.; PALADE, G.E.; SCHOEFL, G.I. Studies on inflammation. II.The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. J.Biophys.Biochem.Cytol.,11:607-26, 1961.
- MAJNO, G.; GILMORE, V.; LEVENTHAL, M. A technique for the microscopic study of blood vessels in living striated muscle (cremaster). Circulation Res.,21:823-32, 1967a.
- MAJNO, G.; GILMORE, V.; LEVENTHAL, M. On the mechanism of vascular leakage caused by histamine-type mediators. A microscopic study "in vivo". Circulation Res.,21: 933-47, 1967b.
- MANSFORD, K.R.L.; OPIE, L. Comparison of metabolic abnormalities in diabets mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. Lancet,1:670-1, 1968.
- MC DOUGALL, W.A. Penetration pathways of a topically applied foreign protein into rat gingiva. J.peridontol.Res.,6:89-99, 1971.

- MC MULLEN, J.A.; LEGG, M.; GOTTSEGEN, R.; CAMERINI-DAVALOS, R. Microangiopathy within the gingival tissues of diabetic subjects with special reference to the prediabetic state. Periodontics, 5:61-9, 1967.
- MC NAMARA, T.F.; RAMAMURTHY, N.S.; MULVINHILL, J.E.; GOLUB, L.M. The development of an altered gingival crevicular microflora in the alloxan-diabetic rat. Archs.oral Biol., 27:217-23, 1982.
- MERING e MINKOWSKI (1889) apud F.G. COVIAN in "Aspectos fisiológicos de la diabetes experimental por la aloxana". p.263. Cadern.Dient., 1: 263-90, 1946.
- MOWAT, A.G.; BAUM, J. Polymorphonuclear leucocytes from patients with diabetes mellitus. N.Engl.J.Med., 284: 621-7, 1971.
- NASCIMENTO, A.; GUIMARAES, A; VIZIOLI, M.R.; SALLUM, A.W. Lesões periodontais em ratos diabéticos aloxânicos. Rev.Paul.Odontol., 8:5-18, 1985.
- NICOLAU, J.; ROSA, R.; FAVA-DE-MORAES, F. The effect of alloxan diabetes upon n-acetylneuraminic acid concentration in the submaxillary glands of rats. Acta Physiol.Lat.Amer., 19:106-10, 1969.

PAGE, J.C.; HAHN, W.E. A study of supporting structures of the teeth and other tissues following alloxan injection. J.Dent.Res.,27:766, 1948.

PETTIGREW, Jr., J.C.; BEIDEMAN, R.W.; SNYDER, M.B. RABINOWITZ, J.L., A bitewing radiographic study of population of diabetic and nondiabetic rhesus monkeys. J.Periodontol.,51:693-9, 1980.

RAMAMURTHY, N.S.; ZEBROWSKY, E.J.; GOLUB, L.M. The effect of alloxan diabetes on gingival collagen metabolism in rats. Archs.oral Biol.,17:1551-60, 1972.

RAMAMURTHY, N.S.; ZEBROWSKI, E.J.; BAKER, C.; GOLUB, L.M. Alloxan diabetes and reduced bone density in rat mandible. Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.,5: 614-20, 1973.

RAMAMURTHY, N.S.; ZEBROWSKI, E.J.; GOLUB, L.M. Insulin reversal of alloxan-diabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. J.periodont.Res.,9: 199-206, 1974.

RAMAMURTHY, N.S.; GOLUB, L.M. Collagen biosynthetic enzyme activity in diabetic rat gingiva. J.dent.Res., special issue A, 311, 1978.

- RAMAMURTHY, N.S.; SIEGEL, M.; IACONO, V.J.; GOLUB, L.M.
Leucocyte response in the gingival crevice of the
diabetic rat. J.periodont.Res.,14:289-96, 1979.
- RAMAMURTHY, N.S.; GOLUB, L.M. Diabetes increases
collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin.
J.periodont.Res.,18:23-30, 1983.
- RAMAMURTHY, N.S.; GREENWALD, R.A.; SCHNEIR, M.; GOLUB, L.M.
The effect of alloxan diabetes on prolyl and lysyl
hydroxylase activity in uninflamed and inflamed rat
gingiva. Archs.oral Biol.,30:679-83, 1985.
- RENOLD, A.E.; BURR, I.M.; STAUFFACHER, W. Experimental and
spontaneous diabetes in animals: what is their relevance
to human diabetes mellitus? Proc.roy.Soc.Med.,64:
613-17, 1971.
- RERUP, C.; TARDING, F. Streptozotocin and alloxan-diabetes
in mice. Eur.J.Pharmacol.,7:89-96, 1969.
- REUTERVING, C.O.; HAGG, E.; GUSTAFSON, G.T. Root surface
caries and periodontal disease in long-term alloxan
diabetic rats. J.dent.Res.,65:689-94, 1986.
- ROBBINS, S.L. Patologia estrutural e funcional. Rio de
Janeiro, Interamericana, 1974, 1422p.

- ROSE, H. The relationship of hyperglycemia to periodontal disease. J.Periodontol., 44:303-8, 1973.
- RUANGSIRI, C. Changes in islets of Langerhans in living mice after alloxan administration. Anat.Rec., 105:399-427, 1949.
- RUBEN, J.A.; YARDUMIAN, K. Diabetes produced by feeding alloxan to cats. Science, 103:220-1, 1946.
- RUSSEL, B.G. Gingival changes in diabetes mellitus. 1. Vascular changes. Acta Path.Microbiol.Scandinav., 68:161-8, 1966.
- SCHER, S.M.; LAWRENCE, A.M. Functional microangiopathy in alloxan diabetic rats. Acta Endocrinol., 66:357-67, 1971.
- SCHNEIR, M.L.; RAMAMURTHY, N.S.; GOLUB, L.M. Extensive degradation of recently synthesized collagen in gingiva of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J.dent.Res., 63:23-7, 1984.
- SCHNEIR, M.L.; IMBERMAN, M.; RAMAMURTHY, N.S.; GOLUB, L.M. The "in vivo" fractional rate of gingival collagen production in non-diabetic and diabetic rats. J.periodont.Res., 21:56-63, 1986.

- SCHOEFL, G.I. Studies on inflammation. III. Growing capillaries: their structure and permeability. Virch.Arch.path.Anat., 337:97-141, 1962.
- SCHWARTZ, J.; STINSON, F.L.; PARKER, R.B. The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. J.Periodont., 43:270-6, 1972.
- SEIFERT, F.M.; JONES, C.A.; DIXIT, P.K. Macrophage migration inhibition in experimental diabetes. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 170:298-304, 1982.
- SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. Tratado de patologia bucal. 4.ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1985. 837p.
- SHEPPARD, I.M. Oral manifestations of diabetes mellitus: a study of one hundred cases. J.Amer.dent.Assoc., 29: 1188-92, 1942.
- STAHL, S.S. The periodontal structures in diabetic mice. J.oral Med., 23:15-7, 1968.
- BZNAJDER, N.; CARRARD, J.J.; RUGNA, S.; SEREDAY, M. Periodontal findings in diabetic and nondiabetic patients. J.periodont.Res., 49:445-8, 1978.
- THEILADE, J.; EGELBERG, J.; ATTSTRÖM, R. Vascular permeability to colloidal carbon in chronically inflamed gingiva. J.periodont.Res., 6:100-9, 1971.

- TOLLEFSEN, T.; SALTVEDT, E. Comparative analysis of gingival fluid and plasma by crossed immunoelectrophoresis. J.periodont.Res., 15:96-106, 1980.
- TOLO, K.J. A study of permeability of gingival pocket epithelium to albumin in guinea pigs and Norwegian pigs. Archs.oral Biol., 16:881-8, 1971.
- WATANABE, G.; INGALLS, T.H. Congenital malformations in the offspring of alloxan-diabetic mice. Diabetes, 12: 66-72, 1963.
- WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. Nature, 289: 646-50, 1981.
- WEEKS, W.T.; SIMS, M.R. The vasculature of the rat molar gingival crevice. J.periodont.Res., 21:177-85, 1986a.
- WEEKS, W.T.; SIMS, M.R. The vasculature of the rat molar periodontal ligament. J.periodont.Res., 21:186-94, 1986b.
- WOEHLER, F. (1838) apud F.D. LUKENS in "Alloxan diabetes." p.304. Physiol.Rev., 28:304-30. 1948.

VIEIRA, S. Introdução à Biostatística. 3.ed. Rio de Janeiro, Ed.Campus Ltda., 1983. 294p.

ZIMMERMAN, A.L.; SABLAY, L.B.; AYNEDJIAN, H.S.; BANK, N.
Increase peritoneal permeability in rats with
alloxan-induced diabetes mellitus. J.Lab.Clin.Med.,
103:720-9, 1984.

APENDICE

10. APENDICE.

Determinação da Glicemia.

A glicemia foi medida por dois métodos; com a utilização do aparelho Glico-Teste (Exata) e através do método da Orto-Toluidina. Tais métodos e resultados são descritos neste anexo.

1. Método do Aparelho Glico-Teste.

A quantificação da glicose com o aparelho Glico-Teste (Exata), se baseia na leitura espectrofotométrica de tiras reagentes (Dextrostrix-Ames, Laboratórios Miles) para glicose no sangue. Para obtenção das amostras de sangue, os ratos foram anestesiados com vapores do éter etílico, pequena quantidade de sangue retirada através de incisão na extremidade da cauda e colocado sobre a tira reagente.

O princípio químico da prova baseia-se na ação da enzima glicose-oxidase, específica para glicose, que catalisa a oxidação da glicose no sangue pelo oxigênio atmosférico, produzindo-se ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. A peroxidase catalisa a reação do peróxido com um sistema cromogênio, produzindo cromogênios oxidados que apresentam cores características, e que de acordo com a quantidade de glicose produzem colorações mais intensas, sendo estas variações de coloração lidas pelo espectrofotômetro do aparelho, com a leitura dada em mg%.

A tabela 1 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos pelo método do aparelho Glico-Teste e o método da Orto-Toluidina, em 10 ratos normais e 10 diabéticos. Pode-se observar nesta tabela, que apesar dos resultados serem ligeiramente superiores pelo método da orto toluidina, tais diferenças não apresentaram-se significativas.

TABELA 1 - Médias e Desvio-Padrão das concentrações de glicose no sangue de ratos normais e diabéticos obtidos pelo método da Orto-Toluidina e pelo aparelho Glico-Teste.

RATOS	ORTO-TOLUIDINA (soro)	GLICO-TESTE (sangue total)
NORMAIS (n=10)	119,15±14,36	108,30± 6,25
DIABÉTICOS (n=10)	367,29±42,82	350,60±20,67

A tabela 2 apresenta a glicemia de 5 ratos normais e 5 diabéticos medidas pelo aparelho Glico-Teste, com diferentes períodos de jejum dos animais. Nesta tabela, para a medida da glicosúria, utilizou-se Glico-Fita (Lilly).

CONDIÇÃO	NORMAIS (n=6)		DIABÉTICOS (n=6)	
	Glicosúria (cruzes)	Glicemia (mg%)	Glicosúria (cruzes)	Glicemia (mg%)
Sem jejum	zero	116,00 [±] 1,11	2,66	366,00 [±] 25,63
Jejum 6 horas	zero	100,25 [±] 8,13	2,00	297,66 [±] 18,50
Jejum 12 horas	zero	104,00 [±] 2,82	1,00	209,00 [±] 9,50
Jejum 24 horas	zero	96,55 [±] 2,89	zero	112,66 [±] 10,96
Jejum 48 horas	zero	110,50 [±] 12,02	zero	117,00 [±] 18,09
2 horas após alimentação	zero	140,50 [±] 24,64	1,33	310,33 [±] 58,59

TABELA 2 - Médias e desvio-padrão da glicemia e glicosúria de ratos normais e diabéticos, em diferentes períodos de tempo de jejum e 2 horas após alimentação.

2. Método da Orto-Toluidina.

Foi utilizado o conjunto de reagentes "bioBRAS" no qual o fundamento do método se baseia em que a glicose em meio ácido e sob aquecimento, através de seu grupamento aldeídico, condensa-se com o grupamento amina da orto-toluidina, levando à formação da mistura em equilíbrio, da correspondente base de Schiff e da glicosil-orto-toluidina. Esta apresenta a coloração azul-esverdeada, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra e possui pico de absorção máxima em 630 nm.

Utilizou-se para obtenção das medidas glicêmicas o plasma (fluoreto de sódio como anticoagulante) e o soro de ratos normais e diabéticos, obtendo-se o sangue através de punção cardíaca. Na obtenção das leituras foi utilizado o seguinte protocolo para cada amostra :

	Branco	Amostra	Padrão
Reagente	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Plasma ou soro	-	0,02ml	-
Padrão	-	-	0,02ml

A seguir os tubos foram homogeneizados, levados em banho-maria fervente por 5 minutos, esfriados em água por 3 minutos, e as leituras feitas em espectrofotômetro (630 nm), acertando o zero com o tubo "branco". A quantidade de glicose em mg% foi calculada da seguinte maneira :

$$FC = 100/AP$$

$$\text{Glicose} = Aa.Fc$$

FC = Fator de calibração
100 = Concentração do padrão

Ap = Absorbância do padrão

Aa = Absorbância da amostra

Na tabela 3 podemos observar medidas glicêmicas do soro e do plasma de 12 animais normais em diferentes períodos de jejum obtidas pelo método da orto-toluidina.

TABELA 3 - Médias e desvio-padrão das concentrações de glicose no soro e plasma de ratos normais obtidas pelo método da orto-toluidina, em diferentes períodos de tempo de jejum.

	SORO	PLASMA
inicial	134,33 ± 14,50	123,33 ± 6,81
Jejum 6 horas	113,00 ± 37,16	121,33 ± 12,09
Jejum 12 horas	96,00 ± 18,30	80,00 ± 8,03
Jejum 24 horas	86,00 ± 2,83	91,00 ± 7,07
TOTAL (n=12)	107,33 ± 21,16	103,91 ± 21,75