



DÉBORA ALINE SILVA GOMES

Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos. Análise bioquímica, macroscópica, radiográfica e dos níveis de mieloperoxidase.

ARARAQUARA
2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



DÉBORA ALINE SILVA GOMES

*Influência do estado diabético na doença periodontal
induzida em ratos. Análise bioquímica, macroscópica,
radiográfica e dos níveis de mieloperoxidase.*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araraquara da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre do Programa de Pós-graduação em
Odontologia – Área de PERIODONTIA.

Orientador:

Prof^ª Dr^ª Denise Madalena Palomari Spolidorio

Co-orientadora: *Prof^ª Dr^ª Andréa Gonçalves*

ARARAQUARA
2006

Gomes, Débora Aline Silva

Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos. Análise macroscópica, radiográfica e dos níveis gengivais de mieloperoxidase/ Débora Aline Silva Gomes. – Araraquara: [s.n.], 2006.

94 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Gonçalves

1. Doenças periodontais 2. Diabetes Mellitus 3. Radiografia
4. Peroxidase 5. Ratos I. Título.

DADOS CURRICULARES

Nome: Débora Aline Silva Gomes

Nascimento: 02/04/1981, Barretos/SP – Brasil

Filiação: Elcio Gomes

Dulce Helena Silva Gomes

1999 - 2003 Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Barretos – FEB.

2003 - 2005 Curso de Especialização em Odontologia, Área de Periodontia, pela Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas - APCD de São José do Rio Preto.

2004 - 2006 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, nível de Mestrado, do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Se eu pudesse...

"Se eu pudesse deixar algum presente a vocês...

Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

Deixaria a capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para vocês se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo,

a resposta e a força para encontrar a saída."

Gandhi

Dedicatória

Dedicatória

Aos que mais amo...

meus Pais Elcio Gomes e Dulce Helena Silva Gomes

e Irmãos Elcio Henrique S. Gomes e Denise Cristina S. Gomes

Dedico essa vitória a quem devo tudo que sou!

Este momento que vivo agora é mágico e só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver comigo o meu sonho. Compartilharam comigo minhas alegrias e tristezas, incentivando-me a prosseguir. A vocês não bastam palavras para expressar meu mais sincero agradecimento.

Agradeço a compreensão, a força, o zelo, a admiração e o amor que vocês dedicaram a mim a partir de cada gesto de carinho e apoio. Desculpe-me a ausência nos nossos momentos familiares, com certeza vocês estiveram e sempre estarão no meu coração.

À Deus

Eu pedi Força...

e Deus me deu Dificuldades para me fazer forte.

Eu pedi Sabedoria...

e Deus me deu Problemas para resolver.

Eu pedi Prosperidade...

e Deus me deu Cérebro e Músculos para trabalhar.

Eu pedi Coragem...

e Deus me deu Perigo para superar.

Eu pedi Amor...

e Deus me deu pessoas com Problemas para ajudar.

Eu pedi Favores...

e Deus me deu Oportunidades.

Eu não recebi nada do que pedi...

Mas eu recebi tudo de que precisava!

*À minha orientadora **Profa.Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio**, por me acolher e incentivar durante todo meu curso de pós-graduação. Agradeço a dedicação e confiança dispensados a mim. Obrigado pelos ensinamentos científicos e por sempre nos deixar a vontade para realização deste trabalho.*

*Ao querido **Prof. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo**, pela confiança, respeito, apoio, incentivo... Obrigado por acreditar no meu potencial e me apresentar a vida científica. Agradeço por me amparar nos momentos acadêmicos e pessoais. Obrigado pela competência, dedicação e por todos ensinamentos científicos, pessoais e espirituais.*

*A minha amiga e companheira de trabalho **Juliana Rico (Jú)**, pelos momentos de alegria e tristeza compartilhados, seja no biotério, no laboratório, no Doces Bárbaros, em nossas viagens, enfim... Agradeço o companheirismo, a amizade, o incentivo, a orientação durante esta fase acadêmica e por todo carinho no convívio diário.*

À minha família que amo Vó Adelaide, Tia Isabel, Fernanda, Paulinho, Maristela, Tia Eusa, Tia Edna, Herbert, Sandra, Júnior e Maryanna, pelo incentivo, carinho, força, por entenderem minha ausência e por todo amor que sempre dedicaram em todos momentos.

A minha adorada amiga Mariana (Nanna), pela amizade, amparo, incentivo e por todo amor e carinho em todos momentos, mesmo que por telefone, torpedos ou e-mails. “Juntas somos fortes, unidas somos imbatíveis!”

Ao querido Rafa, pelo amor e carinho demonstrados a cada dia, por nos encontrarmos nesta vida e estarmos juntos em busca de um crescimento pessoal. Obrigado pelo incentivo, amizade e paciência nos momentos de descontração e descobertas.

Aos amigos do coração, Joaquim Jr. (Jú), Claudinha (parcera), Ana Paula E.M.F., Noêmia (Lolla), Liqe, pelo carinho e amizade que temos mesmo distantes. Obrigado por sempre acreditarem e torcerem por mim. Saudades...

Às amigas “xuxuzinhas”, Dê Andia, Gabi Giro, Jú Rico, Li Zuza, Déia Marcacini e Dani Spirandeli (Nega), pelo convívio diário, festas no AP, finais de semana, horas em frente ao computador, momentos engraçadíssimos durante os créditos, viagens e por todas as horas “ganhas” em conversas, segredos e aprendizado... Cada uma de vocês sabem o q significam para mim!

A minha querida turma de mestrado Dê Andia, Gabi Giro, Dani Spirandeli, Dani Zandim, Fábio, Miltinho, Rafaela, Rafa Faeda, Rafa Sartori, Maurício (vc será sempre da nossa turma) por todos os momentos vividos juntos... e principalmente pela amizade conquistada. Vocês me surpreenderam!

Aos colegas do curso de pós-graduação em Periodontia Andréa, Daniela, Eduardo, Elizangela, Fernanda, Fernando, Jú Moraes, Jú Rico, Paty, Ivy, Vanessa, Bia, Ricardo, Teresinha, Ana Emília, Josiane, Cacá, Carla (darling), Ricardo, Roberto, Romeu, Aline, Yeon, Rubens, por todos momentos agradáveis e alegres, pela amizade e carinho.

Aos amigos do Laboratórios de Microbiologia Cris Duque, Thaís, Ewerton, Carina, Déia, Murilo, Nara, Fabíola, Mariana, Pedro e Ana Maria, pela companhia, paciência e incentivo.

Ao colega Bruno Herrera por nos receber com alegria, disposição e prontidão para realização deste trabalho.

Aos queridos Marcos, Valéria, Carina e Andréa (Déia), nossa equipe de trabalho diário, pela convivência e por toda dedicação para realização deste trabalho.

A querida D.Lívia, por todo carinho e respeito. Agradeço todo acolhimento durante esta etapa.

Aos mestres e funcionários

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação – Área de Periodontia Prof. Dr. Carlos Rossa Junior pela competência, dedicação e responsabilidade.

À minha co-orientadora Profa Dra. Andréa Gonçalves, pelo incentivo, disposição, colaboração e dedicação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio, pela amizade, incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Maria Teresa Pepato pela dedicação e amizade, a quem tenho muita admiração.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, Ilmo diretor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, pela confiança e colaboração para realização deste trabalho.

As Profas. Elaine M. S. Massucato, Mirian Onofre e Silvana R. P. Orrico pelos momentos de descontração vivenciados nas reuniões das “Luluzinhas”, esta convivência trouxe além de amizade e carinho, uma grande admiração.

Ao Prof. Dr. Marcelo Muscará pela colaboração e prontidão na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Elizabeth Pimentel Rosetti pelo incentivo, amizade, competência e conhecimentos divididos durante o curso de especialização.

Ao Prof. Marcelo Vieira Silva pela oportunidade de ingressar na atividade acadêmica (desde a graduação), pelo apoio e incentivo.

À todos docentes do Curso de Pós-Graduação Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. José Eduardo César Sampaio, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof. Joni Augusto Cirelli, Profa. Dra. Silvana Regina Orrico, Prof. Dr. Benedito Egbert de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, pela formação e exemplo.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara na pessoa da Ilma Diretora Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio e do vice-diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Aos funcionários dos Departamentos de Diagnóstico e Cirurgia e Fisiologia e Patologia: Regina Lúcia, Zezé, D. Maria, D. Teresa, Cláudia, Ana Paula, Telma, Sueli, Toninho, Tia Juraci, Edineide, Zé Antonio, Glorinha, Betinha, pelo carinho, paciência e amizade sempre disponíveis.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara e em especial aos funcionários da biblioteca, da esterilização, da triagem, do xerox e da seção de pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho. Agradeço de coração, vocês com certeza colaboraram para meu crescimento profissional e pessoal.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	15
3. Proposição.....	34
4. Material e método.....	35
4.1. Animais.....	35
4.2. Grupos experimentais.....	35
4.3. Períodos experimentais.....	36
4.4. Indução do diabetes	37
4.5. Análise de glicemia, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina.....	37
4.6. Indução da doença periodontal.....	38
4.7. Análise macroscópica.....	39
4.8. Análise do infiltrado inflamatório.....	39
4.9. Análise radiográfica.....	41
4.10. Análise estatística.....	41
5. Resultado.....	42
6. Discussão.....	63
7. Conclusão.....	73
8. Referências	74
Anexos.....	87
Resumo.....	91
Abstract.....	93

Introdução

1 Introdução

A doença periodontal é caracterizada como um processo inflamatório que pode atingir ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar, tendo como fator etiológico primário o biofilme bacteriano. Este biofilme e as respostas associadas ao hospedeiro estão envolvidos na patogênese da doença periodontal (OFFENBACHER, 1996).

A manutenção da integridade dos tecidos periodontais depende do equilíbrio dinâmico entre uma agressão microbiana e/ ou traumática e a resposta do organismo. O desequilíbrio neste mecanismo associado a um comprometimento sistêmico pode exacerbar uma reação inflamatória prévia, levando a uma severa destruição tecidual.

Estudos epidemiológicos revelam que pacientes diabéticos exibem uma maior tendência para o desenvolvimento de doenças periodontais, sendo que diversos fatores têm sido associados à maior severidade das alterações periodontais observadas em diabéticos, incluindo modificações na composição do biofilme bacteriano subgingival e alterações no metabolismo das fibras colágenas dos tecidos causando prejuízo funcional das células de defesa (TAYLOR et al., 1998).

O diabetes mellitus é uma condição patológica de origem não infecciosa causado por insuficiência absoluta ou relativa de insulina que acomete aproximadamente 80% da população mundial (REPORT OF EXPERT

COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003). É caracterizado, principalmente, por hiperglicemia e está associada a uma extensa lista de complicações envolvendo diferentes órgãos e sistemas (CRAWFORD e COTRAN, 2000; GUNCZLER et al., 2001). Na cavidade bucal, destaca-se alta prevalência de doença periodontal severa com abscessos periodontais recorrentes e aumento da predisposição a infecções (LÖE, 1993; NISHIMURA, 1998; LALLA, et al., 2000).

Evidências (LÖE, 1998; LALLA et al., 2000; HOLZHAUSEN et al., 2004), sugerem existir correlação positiva entre diabetes mellitus e destruição periodontal. No sítio infectado, o processo inflamatório é capaz de carrear numerosos componentes do sistema complemento, os quais, ativados por via clássica e/ ou alternativa podem liberar fatores quimiotáticos para leucócitos e elementos vasoativos, potencializando a resposta inflamatória que pode estar alterada no estado diabético.

Tendo em vista a importância do diabetes mellitus como fator debilitante e predisponente para a ocorrência de numerosas patologias de natureza infecciosa, deve-se dar importância à resposta desse hospedeiro em relação à evolução da doença periodontal para melhor entendimento desta patogênese.

Levando-se em consideração a dificuldade de estudar a doença periodontal e o diabetes mellitus em humanos, a utilização de modelos animais pode ser considerada uma alternativa para o estudo de tais patologias, a fim de avaliar mudanças em

margens de osso alveolar, alguns parâmetros fisiológicos e metabólicos e seus padrões comportamentais.

Revisão da literatura

2 Revisão da literatura

2.1 Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus se deve a um transtorno metabólico complexo e primário dos carboidratos, que envolve secundariamente, porém de forma importante, lipídeos e proteínas, associada a resistência à insulina e/ ou a sua deficiência, absoluta ou relativa. As alterações se devem à uma disfunção das ilhotas de Langerhans, também conhecidas como ilhotas pancreáticas, que consistem em um aglomerado microscópico de células do pâncreas, constituído por quatro tipos de células diferentes β , α , δ e PP (polipeptídeo pancreático) (BERGMAN e FELIG, 1995).

As células β representam cerca de 68% da população de células das ilhotas dos adultos e são responsáveis pela produção e armazenamento da insulina, sendo que o estímulo mais importante que deflagra sua síntese e liberação é a glicose. Sendo a hiperglicemia uma das alterações mais frequentes do diabetes, a ocorrência da elevação dos níveis de glicemia resulta em captação de glicose pelas células β e liberação imediata de insulina. Se a liberação de glicose persistir, ocorre somente estimulação da liberação de insulina, mas não sua síntese, o que resulta em hiperglicemia, acúmulo de glicose por falta de síntese de insulina (CRAWFORD e COTRAN, 2000).

Segundo Misawa et al. (2004), a hiperglicemia, também tem sua origem na deficiência insulínica que acarreta maior produção hepática de glicose por inibição da glicogênese (deficiência na regulação da glicoquinase e inibição da glicogênio sintetase), ativação da glicogenólise (ativação da fosforilase) e ativação da neoglicogênese (maior oferta de substratos e ativação de enzimas chaves como piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose 1,6-difosfatase); inibição da captação de glicose pelos tecidos insulina – dependentes (tecido adiposo e muscular).

Segundo Tepperman e Tepperman (1987) e, Felig et al. (1995) as alterações metabólicas freqüentemente encontradas no estado diabético são: perda de peso, apesar do grande consumo alimentar que ocorre no indivíduo ou animal diabético, aumento do volume urinário e da ingestão líquida, hiperglicemia, glicosúria e elevação de uréia urinária. De acordo com os autores citados, a perda de peso ou falta de crescimento corporal é explicada pela deficiência de insulina, e conseqüente aumento de glucagon, e outros hormônios antagonistas da insulina que causam: ativação da lipase hormônio sensível por fosforização, a qual acarreta lipólise com perda de tecido adiposo; ativação da proteólise muscular com perda de massa muscular; inibição da captação de aminoácidos pelo tecido muscular assim como também queda na síntese protéica e com isso redução na massa muscular; inibição na captação de glicose pelo tecido adiposo e inibição da síntese e deslocamento da lipase lipoprotéica, o que inibe a formação de gordura neste local.

Segundo Felig et al. (1995), a maior ingestão de alimentos dá-se em função do centro da saciedade localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial necessitar de insulina para a captação de glicose, e assim inibir o centro da fome. A insuficiência de insulina e a não inibição do centro de saciedade induz a uma maior ingestão de alimentos. Na ausência de insulina, a glicose não entra no hipotálamo ventro-medial, que por sua vez deixa de inibir o hipotálamo ventro-lateral responsável pela sinalização da fome. A área ventro-lateral, livre de inibição, sinaliza falta de glicose e fome, com conseqüente estímulo para maior ingestão de alimentos.

De acordo com Soskolne e Klinger (2001), a perda de água (poliúria) que acompanha o quadro diabético leva a desidratação, a qual se processa em função da perda de glicose, uréia e corpos cetônicos (alteração dos metabolismos de carboidratos, proteínas e lipídeos), os quais são eliminados do organismo pela urina. A desidratação propiciada pela poliúria e aumento da osmolaridade do sangue promovido pela hiperglicemia faz passar água do meio intracelular para o extracelular a fim de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é percebida por osmorreceptores cerebrais, desencadeando sede intensa. Este mecanismo é provavelmente o responsável pelo aumento da ingestão de água (polidipsia) presente no estado diabético.

Quando a hiperglicemia atinge valores acima de 180mg/dL, que é o limiar de absorção renal, a glicose excedente é eliminada do organismo pela urina, sendo este processo denominado glicosúria (PEPATO et al. 1996).

Taylor et al. (1998), mostraram que o elevado nível de uréia verificado no diabetes tem origem na alteração do metabolismo de proteínas. Esta alteração manifesta-se por deficiência da síntese de proteínas, ativação da proteólise e redução na captação de aminoácidos pelos tecidos, efeitos esses causados pela falta de insulina. A maior concentração de aminoácidos no sangue leva a uma maior oferta de substratos para a neoglicogênese hepática, pelo aproveitamento da cadeia carbônica dos mesmos e o grupo amino no fígado dá origem a maior produção de uréia, a qual é secretada para o sangue e eliminada posteriormente pela urina.

Na queda da insulina, também observa-se inibição da lipase lipoprotéica o que causa deficiência na hidrólise dos triacilgliceróis endógenos ou exógenos e conseqüentemente deficiência na entrada de ácido graxo livre no tecido adiposo. Isso explica a hipertrigliceridemia característica do diabetes que também pode ser atribuída a produção hepática dos triacilgliceróis, causada pela maior captação de ácido graxo pelo fígado, proveniente da acelerada lipólise (TEPPERMAN e TEPPERMAN, 1987; FELIG et al., 1995).

Dentre os vários tipos de diabetes, existem 2 tipos principais de diabetes primário: a) diabete tipo 1 (diabete insulino-dependente), conhecido também como diabete juvenil e b) diabete tipo 2 (diabete não-insulino-dependente) ou tardio (EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2000). O tratamento do diabetes tipo 1 é realizado com insulina exógena enquanto que o tipo 2 pode ser tratado

apenas com dieta específica, exercício físico e hipoglicemiantes orais. Porém, a efetividade das drogas hipoglicemiantes é limitada e influenciada por uma variedade de efeitos adversos, incluindo hipoglicemia (DAVIS e GRANNER, 1996; DAVIS, 2004; CAMACHO et al., 2005). Esses dois tipos de diabetes se diferem na apresentação clínica, origem genética, patogênese, lesões das ilhotas pancreáticas e resposta à insulina.

2.2 Diabetes Mellitus e Doença Periodontal

A relação entre o diabetes mellitus e a doença periodontal vem sendo estudada há muito tempo, a partir de uma associação biológica na qual pessoas diabéticas têm maior susceptibilidade para muitos tipos de infecção. Løe (1998), reconheceu a doença periodontal como a sexta complicação mais comum do diabetes mellitus.

Alguns fatores podem contribuir para o desenvolvimento da doença periodontal em diabéticos, como defeito na função e quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares (PMN), alteração de síntese e metabolismo do colágeno, aumento da atividade de colagenases, acúmulo de produtos finais da glicosilação (AGES) que atuam sobre receptores de macrófagos e monócitos resultando em aumento na secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e prostaglandina (PGE₂) (NISHIMURA et al., 1998; SALVI et al., 1998; LALLA et al., 2000; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY

COMMITTEE ON RESEARCH SCIENCE AND THERAPY, 2000), mudança vascular patológica, comprometimento do potencial de cicatrização de feridas e desequilíbrio microbiológico (ZAMBON et al., 1988; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1996; GROSSI, 2001; IACOPINO, 2001).

2.2.1 Condição periodontal no estado diabético

Dentre as manifestações orais importantes, Løe (1993); Nishimura et al. (1998); Lalla et al. (2000), sugerem a ocorrência e aumento da severidade da doença periodontal crônica, abscessos periodontais recorrentes e aumento da predisposição a infecções.

A alta porcentagem da glicose nos tecidos moles, além de proporcionarem baixa resistência destes tecidos ao estresse, pode resultar em necrose da gengiva marginal como resultado da circulação sanguínea deficiente, falta de resistência do osso alveolar ao estresse, aumento da perda das estruturas de suporte e mobilidade dos dentes (TAYLOR et al., 1998; BENATTI et al., 2003).

Avaliando a relação entre o equilíbrio metabólico e a inflamação gengival de pacientes diabéticos, Karjalainen e Knuutila (1996), observaram sangramento gengival pronunciado em indivíduos com controle metabólico pobre, confirmando assim, a relação entre o equilíbrio de glicose e a inflamação gengival. Buscando esclarecer uma associação entre diabetes mellitus e doença periodontal, os autores

concluíram que, independente do tipo de diabetes mellitus, o grau de controle dos níveis glicêmicos, a duração da doença e a idade do paciente são fatores relacionados positivamente com a prevalência e severidade da doença periodontal em pacientes diabéticos.

Avaliando o grau de comprometimento dos tecidos periodontais entre pacientes diabéticos e não-diabéticos com doença periodontal, Taylor et al. (1998), demonstraram que indivíduos diabéticos apresentavam maiores valores de profundidade de sondagem, níveis de inserção, níveis de perda óssea e prevalência mais acentuada de periodontite avançada. O acompanhamento, por 10 anos, do curso clínico natural da doença periodontal em indivíduos diabéticos mostrou que o índice gengival triplicou durante esse período, havendo variação mínima dos depósitos de biofilme dentário (NOVAES et al., 1997).

2.2.2 Alterações nos tecidos periodontais no estado diabético

Em resposta aos altos níveis de glicose característicos do diabetes mellitus ocorrem alterações teciduais no periodonto que podem ser definidas como fatores modificadores do curso clínico da doença periodontal.

Segundo Ohgi e Johnson (1996), destacam-se entre esses fatores, as alterações na atividade e expressão de fatores de crescimento, incluindo um grupo de mecanismos que podem potencialmente contribuir para muitos dos problemas

sistêmicos encontrados em diabéticos, entre eles o processo de cicatrização. A expressão do fator básico de crescimento de fibroblastos apresenta-se alterada no paciente portador de diabetes, devido aos altos níveis de glicose, ocasionando inibição do crescimento das células do ligamento periodontal.

A fibronectina, que funciona como um sinalizador para as células do ligamento periodontal entre o meio intracelular e o extracelular, sofre alterações frente aos altos níveis de glicose, repercutindo, assim, em mudanças morfológicas e morte das células do ligamento periodontal. Alterações da fibronectina em relação à glicose acarretam, ainda, diminuição da resposta quimiotática das células do ligamento periodontal para o fator de crescimento derivado de plaquetas. Esse pode ser o mecanismo que explica a dificuldade de cicatrização em pacientes diabéticos e pode ser a causa da destruição periodontal mais severa observada nesses pacientes (NISHIMURA et al., 1996).

Iacopino (1995), afirma que a hiperlipidemia é uma condição que quase sempre acompanha a hiperglicemia em diabéticos, apresentando-se como metabolismo anormal de gorduras e alterações de reações básicas moleculares e celulares, que interferem nas funções dos neutrófilos e acarretam o desenvolvimento de complicações do diabetes que se traduzem no prejuízo da cicatrização de feridas e na destruição observada na doença periodontal.

O infiltrado do tecido conjuntivo de pacientes diabéticos é caracterizado pela presença de menos fibroblastos e colágeno e mais plasmócitos, em relação ao

que se observa em pacientes não diabéticos, conforme observado por Seppälä et al. (1997). Os autores relataram que histologicamente, foi detectado a presença de infiltrado de células inflamatórias do tecido conjuntivo na terminação mais apical do epitélio juncional, embora a gengiva possa parecer clinicamente saudável.

Segundo Lalla et al. (1998), a consequência crítica da hiperglicemia é a glicolização não-enzimática e a oxidação de proteínas e lipídios, que após uma série de reações, resulta na formação irreversível de produtos finais de glicolização avançada ou AGEs (“advanced glycation end products”), que se acumulam em grau acentuado no plasma e em tecidos de pacientes com diabetes. Os AGEs tem seu efeito patogênico pela interação com seus receptores específicos, conhecidos por RAGEs (“receptor for advanced glycation end products”), que são imunoglobulinas da superfície celular presentes em níveis acentuados em células-alvo de diabéticos, como células endoteliais e monócitos. A interação entre os AGEs dos tecidos periodontais e os RAGEs dos monócitos leva a uma ativação crônica dessas células com consequente produção de mediadores da inflamação como TNF- α (fator de necrose tumoral- α), interleucina 1 β e interleucina 6, cujos efeitos podem resultar na ativação de osteoclastos e colagenases, conduzindo a uma destruição do osso e do tecido conjuntivo. A interação dos AGEs com os RAGEs das células endoteliais também pode resultar na perpetuação da resposta inflamatória (LALLA et al., 1998).

Grossi e Genco (1998), relatam que a infecção periodontal, condicionada por células fagocitárias como monócitos, pode induzir a um estado crônico de

resistência à insulina, contribuindo para o ciclo de hiperglicemia. Devido à contínua ligação e ao acúmulo da proteína AGE, amplia-se, assim, a trilha clássica de destruição de tecido conjuntivo no diabético. Dessa forma, há um sistema de relação dupla da resposta metabólica e destruição tecidual, resultando em doença periodontal mais severa em maior dificuldade de controlar a glicemia do diabético.

Em 1998, Salvi et al. avaliando a resposta de mediadores da inflamação, observaram que pacientes diabéticos apresentavam níveis significativamente maiores de prostaglandina 2 e interleucina 1 β no fluido gengival quando comparados a não-diabéticos controlados com estado periodontal similar. Tais pacientes possuíam uma reação inflamatória exagerada em resposta às bactérias gram-negativas da infecção periodontal, a partir da atividade hipersecretória dos monócitos na produção de mediadores da inflamação.

Dessa forma, as alterações teciduais no periodonto de pacientes com diabetes, com produção anormal de mediadores da inflamação, sugerem uma modificação na resposta do hospedeiro frente às agressões e parecem conduzir à maior severidade da doença periodontal.

2.2.3 *Diabetes experimental*

Na literatura diferentes metodologias têm sido propostas para indução do diabetes em animais, como a utilização de aloxana (ALX) (MCMILLAN, 1970), pancreatectomia parcial (GRANDINI, 1978) e indução pela estreptozotocina após injeção endovenosa de prolina triptada [H] (PEPATO et al., 1996).

Entretanto, um dos modelos de diabetes mellitus experimental mais utilizado atualmente, é a administração do antibiótico estreptozotocina (STZ) (MURATA et al., 1999).

A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico produzido pelo *Streptomyces achromogens* e é utilizado para a indução do *Diabetes Mellitus* em animais experimentais e também no tratamento de neoplasma do pâncreas. A STZ é uma 2-deoxi-D-glicose a qual destrói seletivamente as células β pancreáticas (ANDERSON et al., 1974), causando degranulação destas células produtoras de insulina após uma hora à sua administração por via endovenosa e conseqüentemente promovendo o aparecimento do diabetes (GOODNER et al., 1995). Esta droga possui em sua molécula um núcleo glicídico, que é reconhecido pela célula β , permitindo a sua entrada no interior da célula o qual inibe a atividade da superóxido dismutase, permitindo o acúmulo de radicais livres (ROBBINS et al., 1980), tóxicos a células β (ANDERSSON e GRANKVIST, 1995; FISCHER et al., 1995).

Este acúmulo de radicais livres (JANSSON e SANDLER, 1992) pode produzir a quebra no DNA nuclear por metilação de guaninas via cátions metila (MURATA et al., 1999) e pode então, ocorrer a ativação da enzima reparadora poliadenosina difosforibose sintase (YAMAMOTO et al., 1999), que utiliza nicotimida adenina dinucleotídeo (NAD) como substrato. O aumento da atividade dessa enzima pode então levar a uma queda dos níveis de NAD intracelular, e conseqüentemente provocar importante inibição da respiração celular, da produção de ATP, da síntese protéica e perda do balanço iônico normal, com a morte celular (ROBBINS et al., 1980).

Outro mecanismo suposto é que a STZ, sendo um forte agente alquilante provoca a alquilação do DNA pelo $\bullet\text{CH}_3$ ou CH_3^+ na via de decomposição da STZ. Esta alquila que poderá, então, ser responsável por induzir apoptose e, subseqüentemente o diabetes (MURATA et al., 1999).

2.2.4 Doença Periodontal experimental

Há uma diversidade muito grande de espécies microbianas no biofilme subgingival do periodonto humano e, a destruição tecidual proveniente das respostas imunoinflamatórias do hospedeiro frente a esta complexa microbiota, é estudada, quase sempre, de maneira retrospectiva. O modelo animal mais freqüentemente utilizado em estudos de periodontite experimental é o rato (*Rattus norvegicus*) por ser considerado um grupo de custo baixo e de fácil manipulação (KLAUSEN, 1991).

A utilização de modelos animais na elucidação da patogênese da doença periodontal e do diabetes explica-se pela grande dificuldade de estudar a doença periodontal em humanos.

Dentre os métodos para indução de doença periodontal, Johnson (1975) e Nyman et al. (1979), utilizaram como modelo da doença, o método de indução por ligadura que consiste na colocação de um fio nylon, de seda ou de algodão ao redor da cervical de um molar.

Utilizando este mesmo modelo de indução de doença periodontal, Johnson (1975), observou achatamento e descolamento da margem gengival, acúmulo de placa bacteriana, aumento da proliferação de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente, migração do epitélio juncional e reabsorção da crista óssea alveolar mesial, verificada por meio de análise radiográfica, 17 dias após a colocação das ligaduras em primeiros molares inferiores em ratos.

Sallay et al. (1982), mostraram que 9 a 14 dias após a colocação de ligadura, foi possível observar histologicamente, destruição óssea alveolar horizontal, sequestro ósseo e leucocitose na corrente sanguínea periférica.

Bezerra et al. (2000), observaram, em análise macroscópica, que uma perda óssea alveolar significativa pode ser encontrada logo após 4 dias da colocação de ligadura, alcançando um pico máximo aos 7 dias, quando além de uma reabsorção óssea severa, pode ser observado, histopatologicamente, um infiltrado inflamatório progressivo e aumento do número de osteoclastos.

Estudos macroscópicos realizados por Holzhausen et al. (2002), mostraram que a gengiva dos ratos submetidos a colocação de ligadura modificaram-se gradativamente em relação aos períodos experimentais utilizados no estudo e, em todos os períodos, a ligadura favoreceu o acúmulo de grande quantidade de restos alimentares e a eventual formação de biofilme bacteriano. Os autores observaram ainda o aumento de volume da gengiva, da face vestibular dos primeiros molares inferiores, recobrando grande parte da ligadura, sendo que esta característica foi facilmente observada a partir do período experimental de 5 dias.

2.2.5 Estudos com animais

McMillan (1970), após indução do diabetes em ratos com ALX e subsequente extração dos primeiros molares superiores esquerdos, observou macroscopicamente, que, mesmo nos ratos diabéticos controlados com insulina, quando o diabetes apresentou-se severo, resultou no aparecimento de infecção. Relatou ainda que nenhuma diferença foi observada no padrão de cicatrização das feridas cirúrgicas entre os grupos controle, diabético não controlado e diabético controlado com insulina, entretanto, houve diferenças marcantes na cronologia deste processo entre os diabéticos (controlado e não controlado) em relação ao controle.

No ano seguinte, McMillan (1971), por meio de análise microscópica dos grupos, anteriormente estudados macroscopicamente, observou que a reparação dos alvéolos dos animais diabéticos que receberam ou não insulina,

apresentou-se retardada e mesmo quando o coágulo sanguíneo formado estava aparentemente normal, a resposta inicial inflamatória estava diminuída. A presença de fragmentos ósseos no alvéolo pós-extração excitaram uma resposta inflamatória localizada no grupo controle, enquanto no grupo diabético levaram a uma maior sequestração óssea, com conseqüente necrose e maior predisposição à infecção.

O autor acima citado, atribui a causa do retardo reparacional observada nos ratos diabéticos, em parte, ao aumento do trauma durante os procedimentos de extração dental e em parte, a um ou mais fatores combinados como: redução da quantidade de coágulo sanguíneo, redução da resposta inflamatória, aumento da susceptibilidade á infecção, diminuição da resposta fibroblástica e uma aparente redução na capacidade de epitelização.

Holzhausen et al. (2004), investigaram o efeito do curto tempo de diabetes experimental associado a terapia de insulina sobre a severidade da perda óssea em ratos e o efeito da periodontite experimental sobre o controle da glicemia por meio do monitoramento do sangue dos animais e radiografias digitalizadas para análise da perda óssea alveolar. Observou-se que a severidade da doença periodontal não foi afetada pelo curto tempo de diabetes e que, a periodontite experimental aumentou os níveis de glicose do sangue, proporcionando assim um descontrole do diabetes experimental.

2.3 Alterações sorológicas no estado diabético

Segundo Scott et al. (1984), pôde-se observar mudanças enzimáticas no soro dos indivíduos com o desenvolvimento do diabetes, sendo que as mudanças podiam ocorrer devido à própria doença ou como consequência de suas complicações, e estas atividades alteradas, possivelmente podiam refletir alterações nos mecanismos de síntese, degradação, estoque e excreção de enzimas, tais como as fosfatases alcalinas (ALP), aspartato aminotransferase (AST), creatina cinase (CK), a Lactato Desidrogenase (LD), além de cálcio (Ca) e fósforo (P).

Owen et al. (1990), observaram que o aumento da ALP ocorre na maturação de osteoblastos e o aumento de Ca ocorre no estágio de mineralização. As fosfatases alcalinas são um grupo de enzimas localizadas nas membranas das células dos canalículos biliares do fígado, mas também são sintetizadas pelas células osteoblásticas do tecido ósseo e de outros tecidos como o epitélio intestinal, túbulos renais e placenta. Porém as formas encontradas no soro originam-se em sua grande maioria do fígado ou do esqueleto.

Estudos da correlação de enzimas séricas e diabetes são consideravelmente reduzidos na literatura e assim, faz-se necessário tal avaliação para que essas enzimas sejam utilizadas ou descartadas como marcadores do efeito tóxico “tecido-específico” no diabetes experimental. Para tanto, é necessário utilizar-se modelo experimental adequado, que reproduza o quadro diabético. Tais

condições podem ser indiscutivelmente obtidas pela avaliação temporal dos parâmetros alterados no diabetes como por exemplo, peso corporal e glicemia.

2.4 Infiltrado inflamatório - Níveis de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína de aproximadamente 150KDa, tetramétrica, altamente glicada. É abundante em neutrófilos e monócitos, constituindo 5% e 1-2%, respectivamente, do peso seco total dessas células. Está estocada nos grânulos azurófilos primários desses leucócitos e é secretada no meio extracelular e no compartimento fagolisossomal após ativação do fagócito por uma variedade de estímulos, sendo eficiente na morte de microrganismos (ZIPFEL et al., 1997; BUCHMANN et al., 2002).

Por apresentar essas características, alguns estudos na literatura tem usado a quantificação da MPO tecidual, como marcador inflamatório, para estimar o acúmulo de neutrófilos (YAMALIK et al., 2000; BUCHMANN et al., 2002; LISKMANN et al., 2004; WEI et al, 2004).

Yamalik et al. (2000), avaliando os níveis de mieloperoxidase do fluido gengival de pacientes com Periodontite agressiva, Periodontite crônica e Saúde periodontal, observaram que os níveis de mieloperoxidase foram mais baixo no grupo de saúde periodontal quando comparados aos grupos periodontite agressiva e periodontite crônica.

No ano de 2002, Buchmann et al. caracterizaram a atividade de neutrófilos como componente crítico na patogenicidade da doença periodontal. A

atividade leucocitária na periodontite agressiva comparado a periodontite crônica, através de análise de mieloperoxidase no fluido crevicular mostrou atividade leucocitária significativamente maior na periodontite agressiva em relação a periodontite crônica antes e após a terapia. Entretanto, parâmetros clínicos também observados não mostraram diferenças entre os dois tipos de periodontites.

2.5 Perda óssea alveolar – Análise Radiográfica

Por ser considerada, a doença periodontal, uma patologia com envolvimento de destruição óssea, pode-se observar na literatura que exames radiográficos são utilizados para avaliação desta perda óssea alveolar.

O método de subtração de imagens para detectar pequenas mudanças ósseas foi utilizado por Paquette et al. (1997). Entretanto, apesar da precisão do método, este apresenta um custo elevado (ORTMAN et al., 1985; JEFFCOAT et al., 1996).

Reddy (1997) mostrou que um simples método para quantificar a avaliação radiográfica da perda óssea alveolar envolve diretamente medidas da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar. Esta medida de altura óssea pode variar aproximadamente de 1,0 mm quando utilizado filme convencional, para aproximadamente 0,2 mm quando um sistema de imagem digital é usado para analisar uma radiografia padronizada.

No ano de 2000, Nassar et al. utilizando um sistema de imagem digital (CDR), observaram a perda óssea alveolar de ratos com doença periodontal

induzida por ligadura e tratados com ciclosporina A. As radiografias digitais foram analisadas, realizando-se medida linear percorrendo a distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior no rato, utilizando o software do sistema de imagem digital citado.

Portanto, a fim de avaliar mudanças em margens de osso alveolar durante o processo de evolução periodontal, a utilização de um exame radiográfico adequado se faz necessário para que possa colaborar como diferente parâmetro de avaliação das possíveis alterações encontradas nos experimentos.

Proposição

3 Proposição

Estudar a influência do Diabetes Mellitus sobre a evolução da doença periodontal induzida, avaliando peso corporal, níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e mieloperoxidase, além de mudanças em margens gengivais e em margens de osso alveolar dos espécimes de cada animal.

Material e método

4 Material e método

√ Comitê de ética em pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, processo: 28/2003.

4.1 Animais

No presente trabalho foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus albinus*, Wistar) machos, jovens com peso inicial de aproximadamente 140g, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas, separados de acordo com o grupo experimental, em sala com temperatura ambiente controlada, com ciclos de luz-escuro de 12 horas e, alimentados com ração normal e água *ad libitum*.

4.2 Grupos experimentais

Cento e vinte e oito (128) ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais de 32 animais:

I Grupo Controle (n=32)

II Grupo Diabético induzido (n=32)

III Grupo Doença Periodontal induzida (n=32)

IV Grupo Diabético e Doença Periodontal induzida (n=32)

4.3 Períodos experimentais

A cronologia proposta para este trabalho pode ser observada na Tabela 1. Após 48 horas da indução do diabetes (dia -1), foi realizado a comprovação do estado diabético e em seguida realizada a indução da doença periodontal nos grupos III e IV. Este momento foi considerado o dia zero (baseline) e, a partir de então, os ratos receberam diariamente ração normal e água *ad libitum*.

Os períodos experimentais para o presente trabalho foram 3º, 7º, 15º e 30º dia após o dia zero, sendo que a cada período foram avaliados: taxa glicêmica, peso corporal, níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e mieloperoxidase, além de, análise macroscópica e radiográfica dos espécimes de cada animal.

A cada período experimental, 8 ratos de cada grupo, foram sacrificados por meio de guilhotina. Logo após o sacrifício, a mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas hemimandíbulas e fixadas em formol tamponado a 10%.

Tabela 1 – Cronologia proposta do experimento

Fase experimental	Períodos experimentais						
	dia -3	dia -1	dia 0	dia 3	dia 7	dia 15	dia 30
	Glicemia		Baseline				
Indução do Diabetes	+						
Avaliação sérica e do peso corporal		+		+	+	+	+
Indução da Doença Periodontal			+				
Sacrifício				+	+	+	+
<i>+ realização do procedimento</i>							

4.4 Indução do diabetes

Após um período de 16 horas de jejum, exceto água *ad libitum*, os animais dos Grupos II e IV receberam, por via endovenosa (jugular), uma dose única de estreptozotocina (STZ) dissolvida em tampão citrato (0.01M; pH 4,5), na concentração de 50-60mg/Kg do animal. Os animais dos grupos I e III receberam também por via endovenosa solução salina (0.15m), com o intuito de promover nestes animais uma indução fictícia do diabetes. A alimentação foi restituída aos animais 1 hora após a administração da droga e da solução salina. Após 48 horas da comprovação do quadro diabético por meio de análise da taxa glicêmica (PEPATO et al., 1996), foi realizada a indução da doença periodontal.

4.5 Análise de glicemia, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina

A análise dos níveis séricos de glicemia, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina foram realizadas, em todos os grupos, por meio de coleta de sangue após corte com tesoura a cerca de 2mm da extremidade distal da cauda de cada animal.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos tipo Eppendorf, contendo heparina (Heparina Sódica – Roche, São Paulo, Brasil). Após centrifugação do sangue para obtenção de plasma foi realizado o teste de glicemia pelo método enzimático da glicose-oxidase (AUTOANALYSER TECHNCON RA-XT, Bayer).

A determinação dos níveis séricos de cálcio e fósforo foram realizadas por meio de uma reação de ponto final (FÓSFORO e CÁLCIO Liquiform – LABTEST).

A fosfatase alcalina do soro, em pH alcalino, hidrolisada libera p-nitrofenol, que tem elevada absorvância em 405nm, sendo diretamente proporcional à atividade enzimática da fosfatase alcalina na amostra (FOSFATASE ALCALINA Liquiform – LABTEST).

4.6 Indução da doença periodontal

Os animais, dos grupos III e IV, receberam anestesia geral para posterior indução da doença periodontal. A anestesia foi obtida com injeção intraperitoneal de 0,08mL/100g por peso corporal de Ketamina (Virbaxyl 2%, Virbac do Brasil Ind. e Com. LTDA) e 0,04mL/100g por peso corporal de cloridrato de xilazina (Francotar®, Virbac do Brasil Ind. e Com. LTDA).

Após anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permite a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula.

A metodologia para indução de doença periodontal por ligadura foi descrita por Holzhausen et al. (2002). Com auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 24, marca Corrente, ao redor dos primeiros molares inferiores bilateralmente de cada animal.

4.7 Análise macroscópica

Após cada período determinado, os animais foram sacrificados e a mandíbula de cada animal foi retirada, fixada em formol tamponado (pH 7.2) durante 48h. Depois da fixação realizou-se a análise macroscópica das mandíbulas com o auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss com aumento de 20x. Foram observadas modificações baseadas em critérios como proposto por Spolidorio (2003) de textura, presença e ou ausência de papila interdental e contorno ou posição da gengiva dos primeiros molares inferiores.

4.8 Análise do infiltrado inflamatório

Uma porção de tecido gengival ao redor dos primeiros molares, de todos os animais, foi removida e utilizada para análise por ELISA da presença de mieloperoxidase (MPO), um marcador de infiltrado neutrofílico (BRADLEY et al., 1982).

√ Atividade da mieloperoxidase (MPO)

As amostras do tecido gengival foram pesadas e adicionado 1 mL de brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, Sigma Chem. Co., EUA) para cada 50 mg de tecido, seguido de homogeneização (Heidolph DiAx 900, Alemanha). Os homogenatos foram aquecidos durante duas horas a 60° C em banho maria e então centrifugados a 10.000g durante 5 minutos. Após o término da centrifugação, os sobrenadantes foram usados como fonte para medida da atividade de MPO.

√ *Dosagem dos níveis de MPO*

Cinquenta microlitros de homogenato foram adicionados a 200 µL de tampão fosfato de potássio, pH 6.0 contendo 0,164 mg/mL de dihidroclorato de o-dianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,0005% de água oxigenada (Merck, Alemanha). A mudança de absorvância (OD) foi medida em leitor de ELISA (Espectra max plus 384, EUA) a 460nm durante 20 minutos a intervalos de 20 segundos. Gráficos mostrando a variação de absorvância em função do tempo foram obtidos, a partir dos quais foram calculados os valores de Vmax/seg. Do gráfico de OD (densidade óptica ou absorvância) em função do tempo em segundos, foi escolhido o intervalo de tempo no qual as medidas de OD mostravam linearidade com o tempo (correspondendo ao valor de r^2 mais próximo de 1), obtendo assim o valor de Vmax/seg. Calculou-se a média das duplicatas e esta foi dividida pela quantidade de tecido contido em cada poço da placa (a cada 10 µL de homogenato correspondem 0,5 mg de tecido). Considerando-se que 1 µmol de H₂O₂ corresponde a uma variação 0,0113 AU (unidades de absorvância), a atividade de MPO foi expressa em unidades de MPO e corrigida pela quantidade de tecido (mg) adicionada ao ensaio segundo a fórmula:

$$\mathbf{MPO\ (U/mg) = Vmax/s \times 60 / 0,0113 / 0,5}$$

Uma unidade de atividade MPO é definida como aquela capaz de degradar um micromol de H₂O₂ por minuto (BRADLEY et al., 1982).

4.9 Análise radiográfica

Foram realizados exames radiográficos, das hemimandíbulas esquerda de todos os ratos, utilizando um sistema de imagem digital, (CDR-Computed Digital Radiograph for Microsoft Windows, Sensy-A-Ray 3.11). Os sensores digitais foram expostos com 70KVvp e 10mA com tempo de exposição de 0,2 segundo, utilizando um aparelho Dabi Atlante. A distância foco/filme foi padronizada em aproximadamente 50cm. As radiografias digitais foram analisadas com a utilização do programa Sigma-Scan 2.0. Para cada radiografia foram realizadas 3 mensurações da medida linear (em pixel) da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos de cada rato. Essas mensurações foram realizadas por um único examinador cego e calibrado, sendo que cada mensuração foi realizada com um intervalo de uma semana em relação a outra de acordo com o estudo realizado por Nassar et al., 2000.

4.10 Análise estatística

As medidas das imagens radiograficas obtidas foram analisadas pelos testes ANOVA e TUKEY, como forma de se observar à significância de 0,05% entre os resultados.

As análises séricas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, glicemia e dos níveis de MPO foram analisadas pelo teste t-Student à significância de 0,05%.

Resultado

5 Resultado

5.1 Análise dos parâmetros fisiológicos e metabólicos dos ratos

Com intuito de analisar a influência do estado diabético na doença periodontal induzida por ligadura em ratos, foram estudados alguns parâmetros fisiológicos e metabólicos para conhecimento do padrão comportamental desses animais.

5.1.1 Peso corporal

Levando em consideração o peso corporal dos animais no dia no qual foi realizada a indução do diabetes (dia -3 do cronograma de execução do experimento), e no momento da confirmação do estado diabético (dia -1 ou dia da glicemia), os animais apresentaram homogeneidade do peso corporal entre os grupos nos períodos estudados. Tal fato mostra-se importante no pareamento do peso corporal dos ratos para realização da indução da doença periodontal (dia 0). Os dados de peso corporal podem ser vistos nas Tabelas A1 e A2 (Anexo 2).

No dia do sacrifício, notou-se um aumento gradual do peso corporal nos grupos I e III em relação ao peso medido após confirmação do estado diabético (glicemia). Em relação aos grupos diabéticos (II e IV), pode-se observar que não houve alteração significativa do peso corporal durante os períodos experimentais 3, 7

e 15 dias, mas apresentaram aumento na média do peso corporal aos 30 dias em relação a todos os outros períodos estudados (Tabela 2)

Tabela 2- Peso corporal em gramas (média \pm DP) no dia do sacrifício dos grupos estudados nos períodos experimentais

Grupos	Períodos			
	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
Grupo I	166 \pm 42 ^{aα}	240.1 \pm 20.3 ^{bβ}	238.2 \pm 44.6 ^{cϵ}	346.3 \pm 32.9 ^{dμ}
Grupo II	161 \pm 35.2 ^{eα}	160.6 \pm 32.5 ^{eχ}	164.4 \pm 38.1 ^{eϕ}	182 \pm 45.8 ^{fν}
Grupo III	187 \pm 17.4 ^{gα}	201.5 \pm 36.2 ^{h$\beta$$\chi$}	249 \pm 32.8 ^{iϵ}	359 \pm 39.7 ^{jμ}
Grupo IV	153.3 \pm 27 ^{kα}	157 \pm 25.4 ^{k$\delta$$\chi$}	158.7 \pm 24 ^{kϕ}	240 \pm 100.2 ^{lπ}

^a Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

^{α} Médias seguidas de símbolos iguais, nas colunas, não diferem entre si em cada período correspondente, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

Baseado na comparação do peso corporal dos animais nas fases experimentais de comprovação do estado diabético (glicemia) e no dia do sacrifício (Tabela 3), tentando analisar a evolução da doença, pode-se dizer que nos grupos não-diabéticos (I e III), independente da presença da doença periodontal, apresentaram ganho de peso estatisticamente significativo em todos os períodos ($p < 0,05$), exceto o grupo controle (I) no período experimental de 3 dias. Em relação aos grupos diabéticos (II e

IV), o grupo diabético com doença periodontal (IV) apresentou ganho de peso significativo nos períodos experimentais 15 e 30 dias, enquanto o grupo diabético (II) apresentou ganho significativo do peso corporal apenas no período experimental de 30 dias.

Tabela 3 - Peso corporal (média \pm DP) no sacrifício dos grupos estudados nos períodos experimentais em comparação com o peso no dia da confirmação do estado diabético

Grupos	Fase Experimental	Períodos			
		3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
Grupo I	Glicemia	158 \pm 16.7	161.4 \pm 15.3*	157.3 \pm 21.7*	150.1 \pm 19.9*
	Sacrifício	166 \pm 42	240.1 \pm 20.3	238.2 \pm 44.6	346.3 \pm 32.9
Grupo II	Glicemia	148 \pm 27.1	153.2 \pm 12.9	147.1 \pm 22.3	136.1 \pm 9.4*
	Sacrifício	161 \pm 35.2	160.6 \pm 32.5	164.4 \pm 38.1	182 \pm 45.8
Grupo III	Glicemia	163.1 \pm 11.5*	164.8 \pm 14.7*	173 \pm 23*	153.1 \pm 14.5*
	Sacrifício	187 \pm 17.4	201.5 \pm 36.2	249 \pm 32.8	359 \pm 39.7
Grupo IV	Glicemia	150.4 \pm 16.9	149.2 \pm 10.3	148.5 \pm 6.3*	143.3 \pm 21.8*
	Sacrifício	153.3 \pm 27	157 \pm 25.4	158.7 \pm 24	240 \pm 100.2

*Diferença estatisticamente significativa em relação às fases experimentais dentro de cada grupo, em cada período correspondente, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

Glicemia – Peso corporal no dia da confirmação do estado diabético

Sacrifício – Peso corporal no dia do Sacrifício

5.1.2 Glicemia

Todos os animais foram analisados quanto à taxa glicêmica no dia da confirmação do estado diabético (glicemia) e no dia do sacrifício em todos os períodos estudados, mesmo nos ratos dos grupos controle (I e III), os quais sofreram uma simulação da técnica de indução do diabetes.

Considerando-se diabéticos os animais com taxa glicêmica acima de 280mg/dL, pode-se dizer, quanto à glicemia, que nos animais dos grupos diabéticos independente de apresentarem doença periodontal induzida, houve uma perpetuação desta condição sistêmica por todo período experimental independente do tempo de estudo (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de glicemia em mg/dL (média \pm DP) no dia de confirmação do estado diabético e no dia do sacrifício dos grupos II e IV nos períodos experimentais

Grupos	Fase Experimental	Períodos			
		3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
Grupo II	Glicemia	528.1 \pm 110.7	676.1 \pm 198.5*	514.9 \pm 55.2*	520.8 \pm 75.7*
	Sacrifício	605.9 \pm 171.6	327.1 \pm 95	673 \pm 86.6	1166 \pm 332.5
Grupo IV	Glicemia	536.1 \pm 102.6	610.8 \pm 111.8*	503.2 \pm 82.9*	524.1 \pm 80.58*
	Sacrifício	468.7 \pm 164.4	321.7 \pm 112.5	640.25 \pm 102	923.6 \pm 285.2

* Diferença estatisticamente significativa em relação às fases experimentais (glicemia e sacrifício) em cada grupo e período correspondente, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

Glicemia – Glicemia no dia da confirmação do estado diabético

Sacrifício – Glicemia no dia do Sacrifício

A fins de conhecimento, os resultados dos níveis glicêmicos dos animais não-diabéticos podem ser observados na tabela A3 (anexo 3).

5.1.3 Cálcio

Em todos períodos e fases experimentais não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de cálcio sérico entre os grupos estudados ($p < 0.05$). Tais resultados podem ser observados na Tabela 5

Tabela 5 - Concentração sérica de cálcio em mg/dL (média \pm DP) nos períodos e fases experimentais estudados

Grupos	Fase Experimental	Períodos			
		3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
Grupo I	Glicemia	9.2 \pm 0.6	9.1 \pm 9.4	9.1 \pm 0.7	8.1 \pm 0.9
	Sacrifício	9.0 \pm 1.3	8.3 \pm 0.8	8.7 \pm 0.7	9.5 \pm 0.3
Grupo II	Glicemia	9.3 \pm 1.9	8.8 \pm 0.7	9.5 \pm 0.4	8.2 \pm 0.5
	Sacrifício	9.1 \pm 0.9	8.5 \pm 0.7	8.8 \pm 0.6	9.1 \pm 0.7
Grupo III	Glicemia	9.1 \pm 0.6	9.0 \pm 0.6	9.6 \pm 0.5	8.5 \pm 0.7
	Sacrifício	9.1 \pm 0.3	8.4 \pm 0.6	8.9 \pm 0.9	8.9 \pm 0.6
Grupo IV	Glicemia	9.0 \pm 0.9	8.6 \pm 0.9	10 \pm 0.6	8.8 \pm 0.6
	Sacrifício	9.2 \pm 1.6	8.8 \pm 1.1	9.0 \pm 1.2	9.2 \pm 0.6

Glicemia – Nível sérico de cálcio no dia da confirmação do estado diabético

Sacrifício – Nível sérico de cálcio no dia do Sacrifício

5.1.4 Fósforo

Em todos períodos e fases experimentais não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de fósforo sérico entre os grupos estudados ($p < 0.05$). Esses resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração sérica de fósforo em mg/dL (média \pm DP) nos períodos e fases experimentais estudados

Grupos	Fase Experimental	Períodos			
		3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
Grupo I	Glicemia	8.7 \pm 1.3	7.8 \pm 0.7	7.4 \pm 0.4	7.7 \pm 0.8
	Sacrifício	7.5 \pm 0.8	8.3 \pm 0.5	7.3 \pm 0.8	7.3 \pm 0.6
Grupo II	Glicemia	7.5 \pm 1.7	7.1 \pm 0.6	6.7 \pm 0.2	6.9 \pm 0.3
	Sacrifício	7.5 \pm 1.1	7.6 \pm 1.3	6.9 \pm 1.1	7.3 \pm 2.9
Grupo III	Glicemia	8.1 \pm 1.4	6.9 \pm 1.1	7.4 \pm 0.5	7.3 \pm 0.4
	Sacrifício	7.9 \pm 0.1	7.7 \pm 0.9	7.6 \pm 1.4	7.6 \pm 0.8
Grupo IV	Glicemia	7.7 \pm 1.4	6.6 \pm 0.6	6.8 \pm 1.0	7.2 \pm 0.5
	Sacrifício	7.4 \pm 0.8	7.1 \pm 0.9	7.4 \pm 1.1	7.7 \pm 0.9

Glicemia – Nível sérico de fósforo no dia da confirmação do estado diabético

Sacrifício – Nível sérico de fósforo no dia do Sacrifício

5.1.5 Fosfatase Alcalina

Em relação à concentração sérica de fosfatase alcalina, os grupos de ratos diabéticos (II e IV) apresentaram aumento na concentração estatisticamente significativa quando comparados aos grupos não-diabéticos em todos períodos e fases experimentais ($p < 0,05$). Na fase experimental glicemia (Figura 1), nos períodos tardios de 15 e 30 dias, o grupo diabético com doença periodontal (IV) apresentou aumento na concentração sérica de fosfatase alcalina estatisticamente significativa ($p < 0,05$) comparado com os demais grupos, enquanto que na fase do sacrifício, esta diferença foi observada somente aos 30 dias (Figura 2). Os dados podem ser observados na Tabela A4 (Anexo 4).

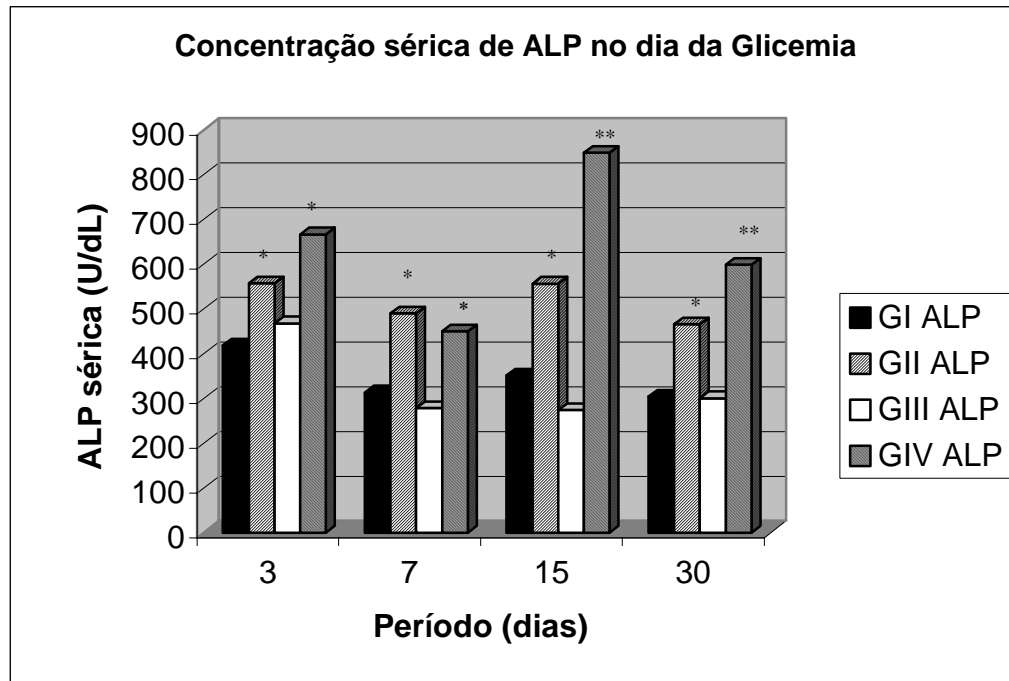


Figura 1 - Concentração sérica de fosfatase alcalina (ALP) na fase experimental glicemia.

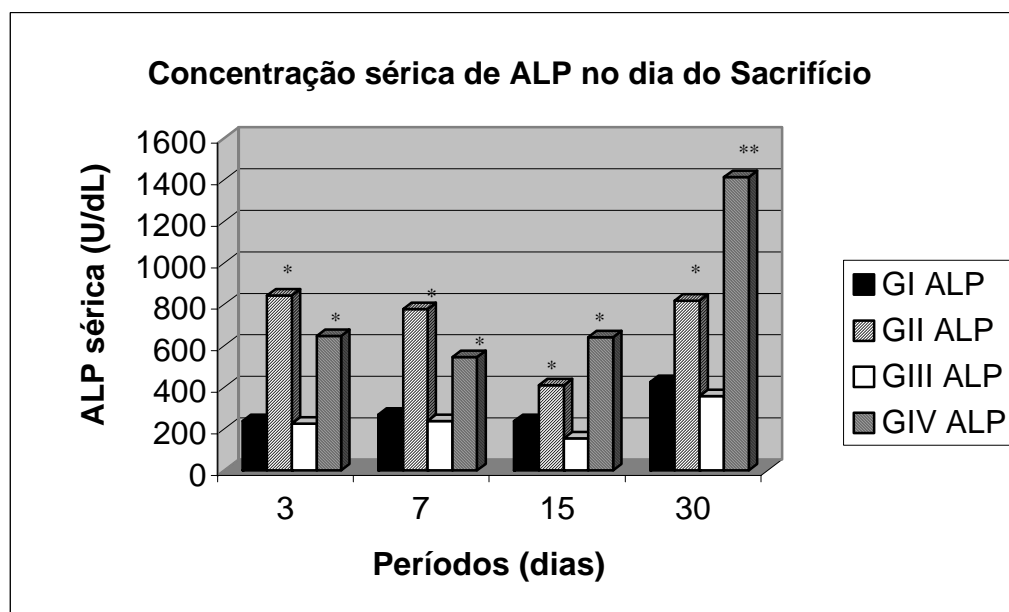


Figura 2 - Concentração sérica de fosfatase alcalina (ALP) na fase experimental do sacrifício.

5.2 Aspectos macroscópicos da gengiva

Levando em consideração as alterações observadas na gengiva, com auxílio de lupa estereoscópica, pode-se dizer que macroscopicamente, não houve diferença entre os grupos não-diabéticos (I) e diabéticos (II) em todos os períodos experimentais, entretanto, observou-se modificações de textura, presença e ou ausência de papila interproximal e contorno ou posição da gengiva entre os grupos com doença periodontal (III e IV) e sem doença periodontal (I e II). Deve-se salientar que todas as ligaduras permaneceram até o final de cada período experimental.

As gengivas dos primeiros molares inferiores, nas regiões vestibular, lingual e interproximal dos animais dos grupos I e II (sem ligadura) tinham aspectos clínicos semelhantes (Figuras 3 e 4). A gengiva contornava a porção cervical dos dentes, terminando em forma afilada como borda de faca, com papilas interdentais nítidas assumindo formas triangulares. Já nos grupos III e IV (com ligadura) as gengivas da região dos primeiros molares inferiores, apresentavam-se flácida, com migração apical da margem gengival e ausência de papilas interdentais, caracterizando um aspecto inflamatório, tanto na face vestibular como na face lingual (Figuras 5 e 6). Essas características observadas nos grupos III e IV mostraram-se acentuadas nos períodos experimentais de 15 e 30 dias (Figuras 12 e 14).

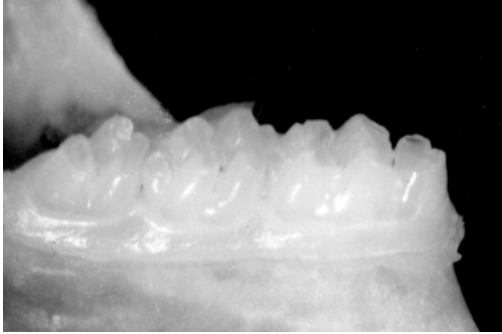


Figura 3: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato não-diabético sem doença periodontal – Grupo I.

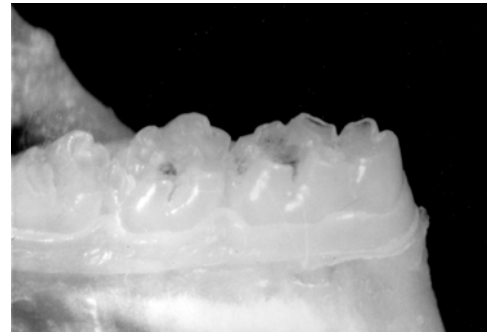


Figura 4: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato diabético sem doença periodontal – Grupo II.

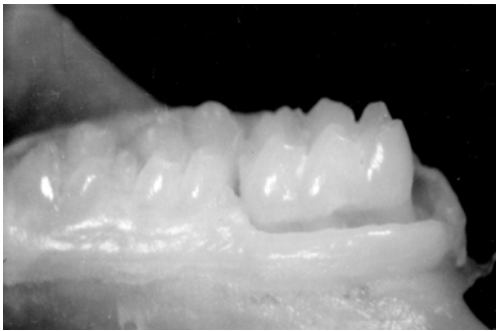


Figura 5: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato não-diabético com doença periodontal – Grupo III.

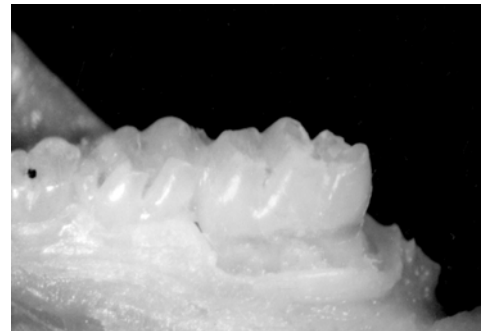


Figura 6: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato diabético com doença periodontal – Grupo IV.

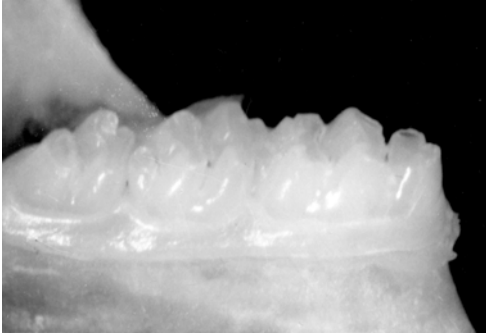


Figura 7: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato sem doença periodontal (3 dias).

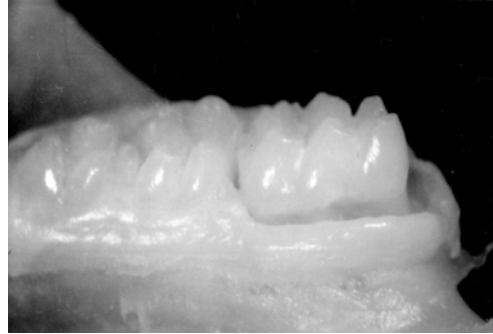


Figura 8: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato com doença periodontal (3 dias).

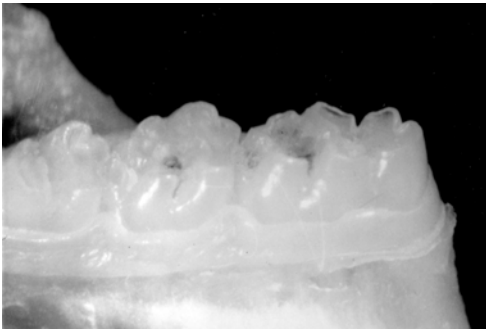


Figura 9: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato sem doença periodontal (7 dias).

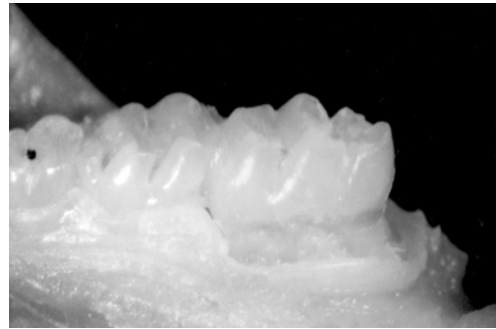


Figura 10: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato com doença periodontal (7 dias).

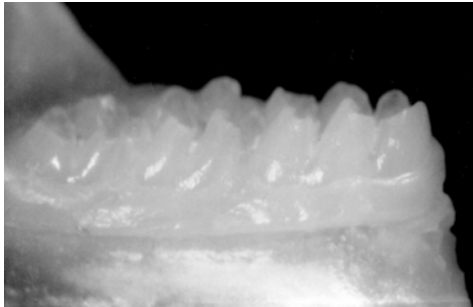


Figura 11: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato sem doença periodontal (15 dias).

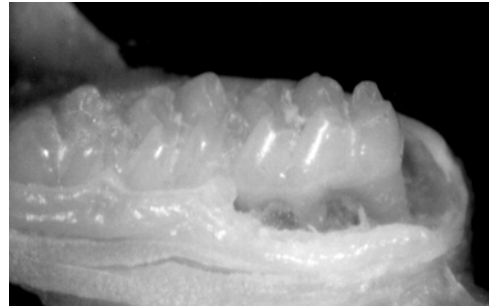


Figura 12: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato com doença periodontal (15 dias).

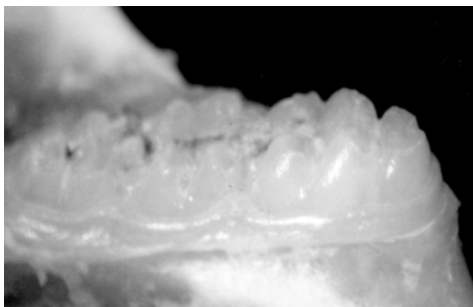


Figura 13: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato sem doença periodontal (30 dias).

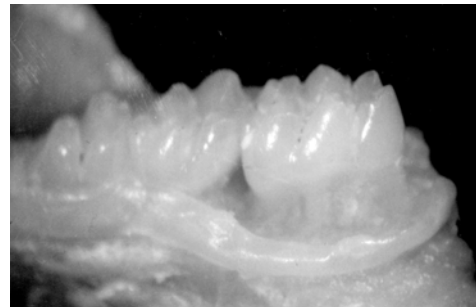


Figura 14: Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato com doença periodontal (30 dias).

5.3 Níveis gengivais de MPO

A quantidade de MPO (mieloperoxidase) liberada nos tecidos gengivais nos diferentes grupos durante os períodos experimentais, pode ser observada na Tabela 8. Segundo os resultados obtidos pode-se dizer que os grupos com doença periodontal induzida (III e IV) apresentaram aumento nos níveis de MPO estatisticamente significante ($p < 0,05$) se comparados com os demais em todos os períodos experimentais de evolução da doença periodontal. O grupo II (diabético) apresentou menor nível de MPO liberado no tecido gengival em relação aos outros grupos.

Em relação aos períodos experimentais analisados pode-se dizer que houve um aumento acentuado estatisticamente significante dos níveis de MPO liberados nos períodos experimentais de 7 e 30 dias em todos os grupos analisados, como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade de MPO em U/mg no tecido gengival (média \pm DP) dos grupos estudados nos períodos experimentais

Grupos	MPO			
	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	100 \pm 13.4 ^{aα}	1295 \pm 370.6 ^{bϵ}	128.9 \pm 90.9 ^{cι}	857.5 \pm 148.3 ^{dλ}
II	44.4 \pm 3.7 ^{eβ}	1704.34 \pm 551.7 ^{fϕ}	120.4 \pm 101 ^{gυ}	1258.3 \pm 460 ^{hμ}
III	419.8 \pm 172.9 ^{iχ}	3518.1 \pm 1365.4 ^{jγ}	1645.4 \pm 764.7 ^{kϕ}	2401.7 \pm 705.6 ^{lν}
IV	541.4 \pm 184.2 ^{mδ}	3704.2 \pm 1271.8 ^{nη}	234.2 \pm 177.4 ^{oκ}	2519.9 \pm 1378.7 ^{pπ}

^a Médias \pm desvio padrão seguidas de letras diferentes, nas linhas, diferem entre si pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

^{α} Médias seguidas de símbolos iguais, nas colunas, não diferem entre si em cada período correspondente, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

5.4 Avaliação radiográfica

Para realização da análise radiográfica considerou-se como perda óssea alveolar a distância medida em pixels, da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar das regiões mesiais dos primeiros molares inferiores.

No dia da indução da doença periodontal (dia 0) observou-se radiograficamente uma distância média da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar de 13 pixels.

Analisando os resultados na Tabela 9, pode-se dizer que nas radiografias das hemimandíbulas dos grupos II e IV foram observadas perdas ósseas maiores quando comparadas aos grupos I e III. Entretanto, apenas o grupo diabético com doença periodontal induzida, apresentou maior perda óssea estatisticamente significativa quando comparada aos demais grupos.

Em relação aos grupos com doença periodontal induzida (grupos III e IV), o grupo diabético (Grupo IV) apresentou perda óssea estatisticamente significativa em relação ao grupo que não sofreu indução de diabetes (Grupo III).

Nos períodos experimentais tardios (15 e 30 dias) pôde-se observar no grupo IV maior perda óssea, com a crista óssea alveolar apresentando reabsorvida, próxima ao osso basal da mandíbula e com envolvimento da área de furca. No grupo II (diabético), radiograficamente, houve apenas uma maior variação na altura da crista óssea alveolar em relação ao grupo controle (grupo I). Tais características podem ser observadas radiograficamente, nas Figuras de 15 a 30.

Tabela 9 - Distância em pixels (média \pm DP) da JCE à crista óssea dos grupos estudados nos períodos experimentais

Distancia em pixels				
Grupos	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	13.85 \pm 3.9 ^{aα}	19.4 \pm 6.9 ^{bϕ}	21.85 \pm 3.7 ^{bδ}	25.28 \pm 3.2 ^{bγ}
II	15.43 \pm 4.4 ^{cα}	20.5 \pm 11.5 ^{dϕ}	28.67 \pm 1.6 ^{eϵ}	30.28 \pm 3.9 ^{eη}
III	19.62 \pm 1.6 ^{fι}	24.4 \pm 9.6 ^{gϕ}	27.2 \pm 4.6 ^{gλ}	29.14 \pm 4.1 ^{gη}
IV	23.37 \pm 2.6 ^{hχ}	26.4 \pm 11.5 ^{iϕ}	37.7 \pm 2.5 ^{iϕ}	40 \pm 2.1 ^{iι}

^aMédias \pm desvio padrão seguidas de letras diferentes, nas linhas, diferem entre si pelo teste Anova (Tukey) ao nível de 5%

^{α} Médias seguidas de símbolos iguais, nas colunas, não diferem entre si em cada período correspondente, pelo teste Anova (Tukey) ao nível de 5%

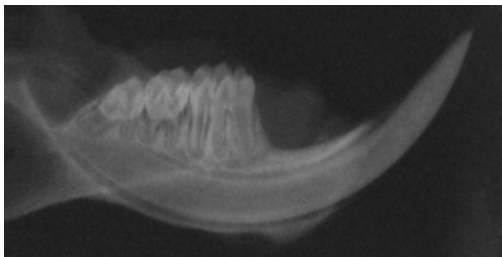


Figura 15: Grupo I (3 dias) – imagem radiográfica mostra crista óssea alveolar próxima a junção cimento-esmalte na mesial do primeiro molar inferior esquerdo.

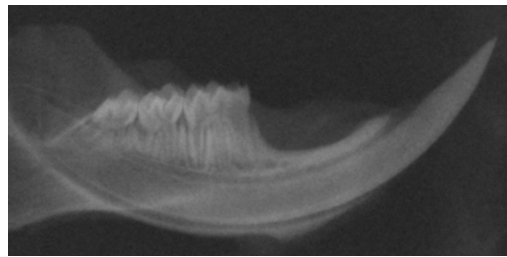


Figura 16: Grupo II (3 dias) - imagem radiográfica mostra crista óssea alveolar próxima a junção cimento-esmalte na mesial do primeiro molar inferior esquerdo.



Figura 17: Grupo III (3 dias) – imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar na mesial do primeiro molar inferior esquerdo.

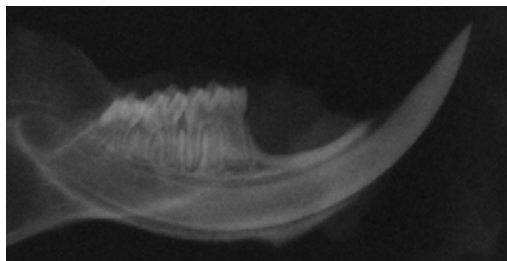


Figura 18: Grupo IV (3 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar na mesial do primeiro molar inferior esquerdo.

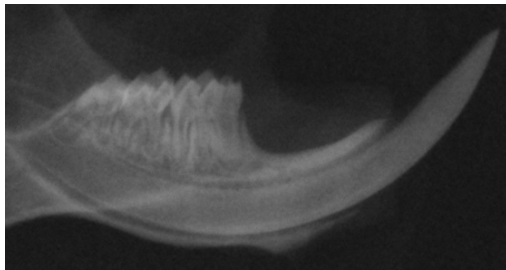


Figura 19: Grupo I (7 dias) - imagem radiográfica mostra crista óssea alveolar próxima a junção cimento-esmalte.

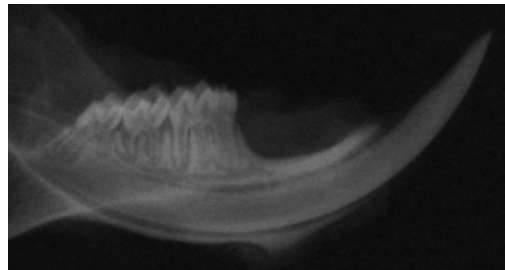


Figura 20: Grupo II (7 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção da crista óssea alveolar mesial do primeiro molar inferior esquerdo.

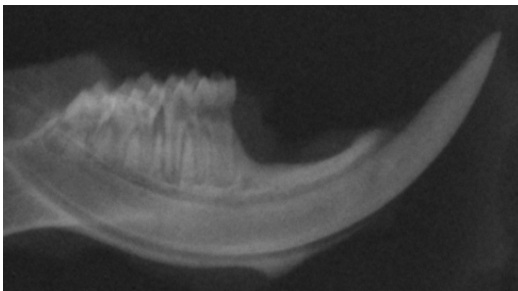


Figura 21: Grupo III (7 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar com o primeiro molar inferior esquerdo apresentando lesão na região de furca.

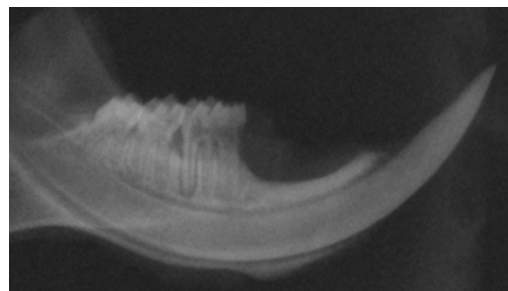


Figura 22: Grupo IV (7 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar com o primeiro molar inferior esquerdo apresentando lesão na região de furca.

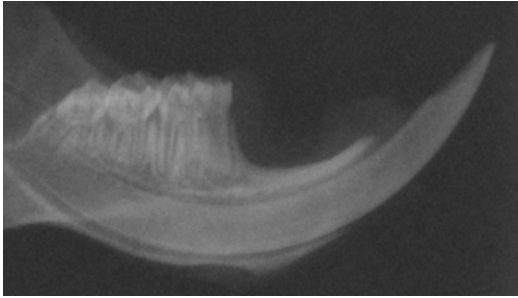


Figura 23: Grupo I (15 dias) - imagem radiográfica mostra crista óssea alveolar próxima a junção cimento-esmalte.

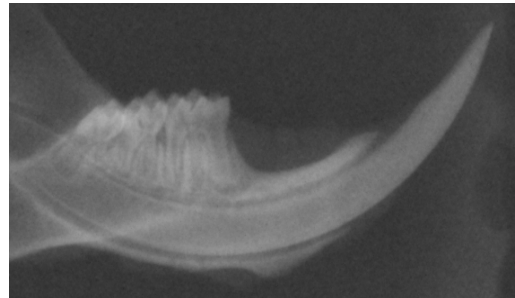


Figura 24: Grupo II (15 dias) - imagem radiográfica mostra crista óssea alveolar próxima a junção cimento-esmalte.

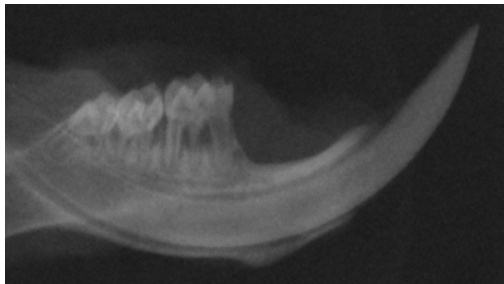


Figura 25: Grupo III (15 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar com o primeiro molar inferior esquerdo.

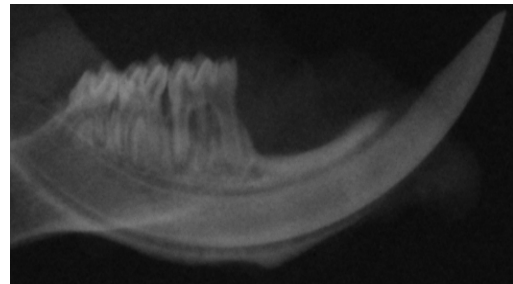


Figura 26: Grupo IV (15 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar com o primeiro molar inferior esquerdo apresentando lesão na região de furca.

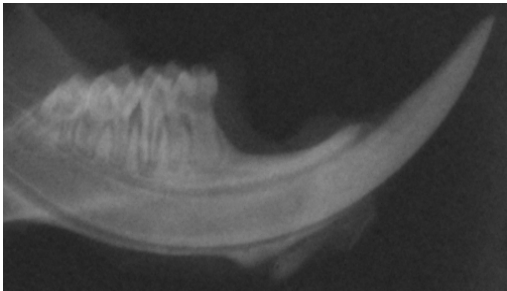


Figura 27: Grupo I (30 dias) – imagem radiográfica mostra reabsorção da crista óssea alveolar na mesial do primeiro molar inferior esquerdo.

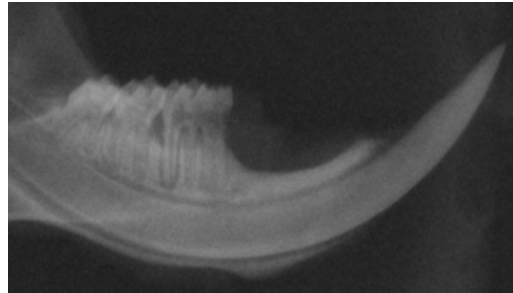


Figura 28: Grupo II (30 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar com o primeiro molar inferior esquerdo apresentando lesão na região de furca.

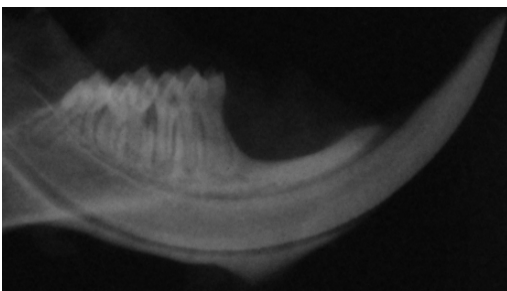


Figura 29: Grupo III (30 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar com o primeiro molar inferior esquerdo apresentando lesão na região de furca.

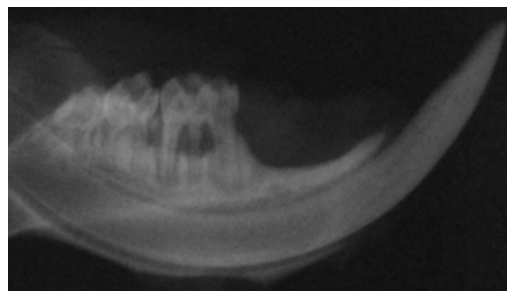


Figura 30: Grupo IV (30 dias) - imagem radiográfica mostra reabsorção óssea alveolar com o primeiro molar inferior esquerdo apresentando lesão na região de furca.

Discussão

6 Discussão

A análise da literatura disponível, demonstra uma preocupação constante dos pesquisadores em ampliar os conhecimentos a respeito do estudo da patogênese da doença periodontal e do diabetes. Muitos estudos epidemiológicos tem demonstrado uma correlação positiva entre diabetes, prevalência e severidade da doença periodontal (GROSSI et al., 1994; GROSSI et al., 2001; BENATTI et al., 2003; HOLZHAUSEN et al., 2004). A alta susceptibilidade do diabetes à infecções pode estar relacionada aos mecanismos de defesa deste tipo de hospedeiro, que é reconhecidamente deficiente.

Alguns autores (NISHIMURA et al., 1998; SALVI et al., 1998; LALLA et al., 2000) acreditam que no diabetes além do defeito na função e quimiotaxia dos leucócitos (PMNs) e da alteração de síntese e metabolismo do colágeno, a destruição periodontal pode ser explicada como resultado indireto do estado hiperglicêmico (LALLA et al., 2000), que pode afetar a resistência do hospedeiro frente ao biofilme.

Com relação ao desenho experimental, a utilização de ratos foi baseada no fato de serem animais de fácil manipulação, custo acessível, além de apresentarem estrutura e organização dos tecidos periodontais dos molares semelhantes aos humanos (PAGE e SCHROEDER, 1982).

No presente estudo, o modelo de doença periodontal induzida desenvolvido por meio da técnica de colocação de ligadura ao redor do dente foi utilizado devido à facilidade de realização, padronização da técnica e maior confiabilidade no desenvolvimento da doença periodontal (JOHNSON, 1975; NASSAR et al., 2003; NASSAR et al., 2004). Este modelo de indução de doença periodontal é caracterizado por um acúmulo progressivo de biofilme bacteriano na ligadura e conseqüente aumento do infiltrado inflamatório, ocasionando assim, destruição dos tecidos periodontais (tecido conjuntivo e ósseo).

Para a indução do diabetes foi utilizado a droga estreptozotocina. Antibiótico este, capaz de promover destruição seletiva das células β do pâncreas e conseqüente diminuição da secreção de insulina, ocasionando assim, um acúmulo de glicose no sangue (MURATA et al., 1999; PEPATO et al., 1999; PEPATO et al., 2002). Fato este que justifica a metodologia empregada.

Considerando estado diabético quando o nível glicêmico está acima de 280mg/dL (PEPATO et al., 1993; PEPATO et al., 1996), nos grupos diabéticos (II e IV) do presente estudo, os resultados glicêmicos apresentaram concordância com esta técnica de indução de diabetes (Tabela 4).

O modelo experimental de doença periodontal associado ao diabetes tem sido foco de estudos em animais com intuito de elucidar o efeito do diabetes sobre o periodonto (DOXEY et al., 1998; LALLA et al., 2000). Tal fato, justifica o interesse do presente estudo em conhecer alguns parâmetros fisiológicos e

metabólicos e seus padrões comportamentais em ratos diabéticos com doença periodontal induzida.

Levando em consideração os resultados metabólicos, pode-se dizer quanto aos parâmetros peso corporal e glicemia, que o experimento da indução de doença periodontal foi iniciado com adequado pareamento dos animais em todos os grupos e períodos (Tabelas 3 e 4). Desta maneira, os grupos II e IV encontraram-se com um quadro diabético semelhante e um nível glicêmico considerado de diabetes severo. Além disso, pode-se dizer que todos os ratos com diabetes induzido mantiveram esta condição até o final do experimento, independente do grupo ou período analisado.

Segundo alguns autores (HOUGH et al., 1981; LASSILA e VIRTANEN, 1989) um dos efeitos do diabetes induzido por estreptozotocina é a perda de peso corporal. Fato este que possivelmente pode explicar ganho de peso corporal não significativo dos grupos diabéticos (II e IV) nos períodos experimentais de 3, 7, e 15 dias, independente da presença da doença periodontal (Tabela 3). Os resultados do presente estudo concordam com os resultados obtidos no estudo de Mishima et al. (2002) no qual ao comparar os pesos corporais entre os grupos de ratos diabéticos e não-diabéticos, em um período experimental de 24 dias, observaram uma perda de peso nos animais diabéticos enquanto nos não-diabéticos, houve um ganho de peso.

Outro fator que possivelmente pode ter afetado o peso corporal dos animais diabéticos foi a hiperglicemia, a qual apresentou-se elevada durante o

experimento (Tabela 4), sendo considerada acima de 280mg/dL diabetes severo. Evidências suportam a idéia de que a hiperglicemia é um dos possíveis fatores responsáveis pelo desencadeamento das complicações diabéticas, como perda de peso (LALLA et al., 2000).

Muitos distúrbios endocrinológicos como, por exemplo, o diabetes apresentam como determinantes bioquímicos de alterações metabólicas e ósseas, a análise sérica de cálcio, fósforo e atividade da fosfatase alcalina (LASSILA e VIRTANEN, 1989). Além disso, tais íons (cálcio e fósforo) apresentam-se associados ao metabolismo ósseo, participando do processo de mineralização (ARANA e KATCHBURIAN, 1999).

Os resultados do presente trabalho mostraram níveis séricos de cálcio similares entre os grupos estudados em todos os períodos (Tabela 5), e estão de acordo com os estudos de Lassila & Virtanen (1989), que em suas investigações bioquímicas, observaram que os valores séricos de cálcio entre os grupos diabéticos e não-diabéticos estudados, eram semelhantes. Entretanto, diferem dos achados de Hough et al. (1981) e, Pepato et al. (2002) que relataram que ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina exibem hipercalcemia, hiperfosfatemia, hipercalcúria e fosfatúria.

Acredita-se que em situações fisiológicas normais, a formação óssea e a progressão de reabsorção estão em equilíbrio, reguladas de modo que, a reabsorção óssea pelos osteoclastos precedem uma nova formação óssea por osteoblastos (CUETO-MANZANO et al., 1999). A presença do diabetes,

entretanto, induz a um desequilíbrio neste dinâmico ciclo de remodelação, com a reabsorção excedendo a formação óssea.

A similaridade de resultado entre os grupos e períodos também foi observada em relação aos níveis séricos de fósforo observados (Tabela 6), os quais apresentaram-se semelhantes independente da presença do diabetes, da presença de doença periodontal ou até mesmo do tempo de evolução da mesma. Dessa forma, tais resultados podem ser hipoteticamente explicados por aumento da excreção urinária de cálcio e fósforo geralmente encontrada nos animais diabéticos, apesar de não ter sido realizado esta análise no presente estudo. Um possível comprometimento do fígado pode também participar do processo, uma vez que em condições fisiológicas, este mineral é excretado por este órgão que apresenta suas funções metabólicas alteradas pelo diabetes (LALLA et al., 2000).

A fosfatase alcalina (ALP) é caracterizada como um marcador de fenótipos de osteoblastos, contribuindo assim para formação óssea no processo de remodelação, sendo excretada na fase de maturação dos osteoblastos (Wong et al, 1990). Como no diabetes o “turn-over” ósseo está desequilibrado, ocorre maior reabsorção óssea. Pode-se dizer que o estímulo para migração osteoblástica continua, sugerindo a elevada taxa de ALP sérica expressa nesses animais diabéticos com doença periodontal induzida (OWEN et al., 1990). Além disso, pelo fato de apresentar menor formação óssea, esses animais poderão ter sua mineralização comprometida.

A atividade sérica de ALP encontrada neste estudo (Figuras 1 e 2) é condizente com achados da literatura como no estudo de Gonzalez & Fevery (1992), no qual os autores afirmam ocorrer uma elevação sérica da enzima (ALP) em ratas com 2 semanas de diabetes. Nos estudos de Koyama et al. (1998), o aumento sérico de ALP também foi observado em ratos diabéticos, induzido tanto pela estreptozotocina como por aloxana.

Apesar do sucesso da indução de doença periodontal por ligadura, este modelo experimental ainda é questionado. Nyman et al. (1979), sugerem que a colocação de ligadura leva invariavelmente a uma injúria traumática e, que apenas secundariamente, atua como fator retentivo de biofilme bacteriano. Tal fato pode explicar que nos resultados macroscópicos do presente estudo, no período de 3 dias observava-se alteração tecidual caracterizada por afastamento da gengiva marginal do dente, mesmo sem haver perda óssea expressiva no exame radiográfico (Figura 8). Esses resultados podem ser confirmados por outros autores (SALLAY et al., 1982), que avaliando a destruição periodontal decorrente da colocação de ligadura juntamente com a administração de antibióticos e clorexidina para o controle do biofilme bacteriano, observaram inibição da perda óssea alveolar, demonstrando o caráter infeccioso da periodontite experimental.

Além disso, segundo os resultados macroscópicos do presente estudo, a colocação da ligadura ao redor do dente do animal provocou alterações significantes nas características macroscópicas da gengiva, independente do estado diabético (Figuras 5 e 6). Os achados do presente estudo concordam com o

estudo de Holzhausen et al. (2002), no qual os autores afirmaram que no desenvolvimento da doença periodontal inflamatória induzida, o acúmulo de biofilme nas superfícies dentais próximas à gengiva, é a causa direta da inflamação periodontal. Entretanto, no presente estudo, o acúmulo de biofilme bacteriano não foi avaliado quantitativa e nem qualitativamente.

Autores como Holzhausen et al. (2005) utilizaram a medição da atividade de mieloperoxidase (MPO) como parâmetro inflamatório da migração de granulócitos nos tecidos. No presente estudo pode-se observar um pico de elevação de atividade de mieloperoxidase aos 7 dias após colocação da ligadura nos grupos com doença periodontal induzida (III e IV), independente da presença do diabetes (Tabela 8). Este fato pode ser explicado devido aos neutrófilos constituírem as células representativas da primeira linha de defesa do organismo frente a estímulos inflamatórios. Quando os neutrófilos migram para os sítios inflamados, são liberados componentes celulares e enzimas que atuam nos tecidos adjacentes sobre outras células e microrganismos na tentativa de controlar a inflamação (BRADLEY et al., 1982). A mieloperoxidase (MPO) é uma dessas enzimas liberadas principalmente pelos neutrófilos que tem demonstrado propriedades antimicrobianas e citotóxicas, bem como habilidade de inativar fatores quimiotáticos que podem limitar a migração de neutrófilos (KLEBANOFF, 1968). Este fato pode explicar a diminuição da quantidade de neutrófilos após os períodos iniciais da inflamação e conseqüente migração de outras células de defesa como monócitos e macrófagos (BRADLEY et al., 1982).

Nos períodos tardios (15 e 30 dias), os níveis teciduais de MPO apresentaram um aumento progressivo que pode ser explicado pela crescente migração de monócitos e macrófagos, que apresentam considerável atividade de peroxidases (BRADLEY et al., 1982). Entretanto, no grupo diabético com doença periodontal induzida (IV), observa-se menor expressão de MPO, provavelmente pelo fato de apresentar comprometimento da resposta imune (Tabela 8).

Além da atuação das peroxidases, o infiltrado neutrofílico pode desencadear a liberação de numerosos mediadores inflamatórios incluindo citocinas e prostaglandinas que além de perpetuarem a inflamação, promovem um desequilíbrio no metabolismo ósseo, estimulando a liberação de osteoclastos, (DENNISON e VAN DYKE, 1997) o que pode justificar a presença de reabsorção óssea, vista radiograficamente, nos grupos com periodontite induzida (III e IV) (Tabela 8).

O desenvolvimento da periodontite experimental foi confirmada pela presença de perda óssea, vista radiograficamente no grupo com doença periodontal induzida (III) (Tabela 9). Nossos resultados podem ser confirmados pelos estudos de outros autores (NASSAR et al., 2003, NASSAR et al., 2004) que observaram perda óssea alveolar nos grupos com doença periodontal induzida, sendo maior aos 30 dias.

A análise radiográfica demonstrou perda óssea semelhante entre os grupos diabético sem doença periodontal (II) e não-diabético com doença periodontal (III) em todos os períodos estudados (Tabela 9). Tal resultado pode

ser explicado devido à própria indução do diabetes que além de causar alterações ósseas, pode promover uma redução no número de osteoclastos (HOUGH et al., 1981, GOODMAN e HORI, 1984, MISHIMA et al., 2002), o que pode sugerir um comprometimento do metabolismo ósseo, reduzindo ou até impedindo uma neoformação óssea.

Mishima et al. (2002), observaram histomorfometricamente que a indução do diabetes por estreptozotocina leva a uma redução nos níveis de formação óssea, sugerindo redução do metabolismo ósseo. Os autores ainda relataram que após tratamento com insulina, os ratos diabéticos apresentaram normalização das medições do “turn-over” do osso alveolar.

O conhecimento e entendimento da resposta do hospedeiro no processo inflamatório da doença periodontal se mostram importante, tanto nos processos biológicos básicos, quanto na aplicabilidade clínica, aprimorando o diagnóstico, fatores desencadeantes e/ou agravantes e possíveis opções de tratamento das doenças periodontais inflamatórias. No entanto, é estabelecido que nem todo acúmulo de biofilme leva ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal, pois é conhecido cientificamente, que outros fatores apresentam um importante papel na maior susceptibilidade de alguns indivíduos à doença periodontal. (WILSON e KORNMAN, 2001). Fato este que pode justificar a perda óssea no grupo de ratos diabéticos com doença periodontal (IV), grupo que pode ser observado radiograficamente no presente estudo (Figuras 22, 26, 30).

Em um estudo com ratos de 5 semanas de vida Klausen (1991) mostrou que esses animais apresentam todos os molares erupcionados. No entanto, esses dentes sofrem, com a idade, uma erupção passiva e contínua remodelação do osso alveolar. Desse modo, a distância entre a junção cimento-esmalte (J.C.E.) e a crista óssea alveolar pode apresentar um aumento fisiológico dependente da idade. Tal fato pode justificar a presença de perda óssea observada radiograficamente no grupo controle (I), visto que os animais utilizados no presente estudo possuíam tempo de vida semelhante (Figuras 15, 19, 23 e 27).

Dessa forma, a severidade da destruição tecidual observada macroscópica e radiograficamente nos períodos tardios do grupo diabético com doença periodontal induzida (IV) pode ser causada pela exacerbação da resposta do hospedeiro com metabolismo ósseo comprometido, no caso o estado diabético, frente ao contínuo estímulo infeccioso (Figuras 22, 26 e 30).

Conclusão

Conclusão

Baseado nos resultados obtidos e dentro das condições experimentais deste trabalho, pode-se concluir que:

1- A doença periodontal não exerceu influência sobre estado hiperglicêmico dos animais diabéticos;

2- Dentre os marcadores bioquímicos analisados (cálcio, fósforo e ALP), somente a fosfatase alcalina (ALP), apresentou níveis elevados nos grupos diabéticos;

3- Macroscopicamente, a periodontite experimental provocou modificações tempo-dependente no tecido gengival;

4- A atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) mostrou-se comprometida nos ratos diabéticos;

5- A perda óssea alveolar, observada radiograficamente, mostrou-se elevada nos grupos com doença periodontal induzida, apresentando-se maior no grupo diabético.

Referências

5 Referências*

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Diabetes and periodontal diseases: position paper. **J. Periodontol.**, Chicago, v.67, n.2, p.166-176, Feb. 1996.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY COMMITTEE ON RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY. Diabetes and periodontal diseases. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n.4, p.664-678, Apr. 2000.

ANDERSON, T. et al. Streptozotocin diabetes. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.54, n.3, p.672-677, Sept. 1974.

ANDERSSON, M.; GRANKVIST, K. Ascorbate-induced free radical toxicity to isolated islet cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Exeter, v.27, n.5, p.493-498, May 1995.

ARANA, V.; KATCHBURIAN, E. **Histologia e embriologia**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.21-39.

BENATTI, B.B. et al. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An *in vivo* study in rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.38, n.3, p.351-353, June 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR-6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BERGMAN, M.; FELIG, P. The endocrine pancreas: diabetes mellitus. In: FELIG, P. et al. (Eds.). **Endocrinology and metabolism**. 3rd. New York: McGraw-Hill, 1995. Cap. 19, p.1107-1250.

BEZERRA, M.M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v.71, n.6, p.1009-1014, June 2000.

BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.78, n.3, p.206-209, Mar. 1982.

BUCHMANN R. et al. Amplified crevicular leukocyte activity in aggressive periodontal disease. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.81, n.10, p.716-721, Oct. 2002.

CAMACHO, R.C. et al. Glucoregulation during and after exercise in health and insulin-dependent diabetes. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, New York, v.33, n.1, p.17-23, Jan. 2005.

CRAWFORD, J.M.; COTRAN, R.S. Pâncreas. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 20, p.809-833.

CUETO-MANZANO, A.M. et al. Bone loss in long-term renal transplantation: histopathology and densitometry analysis. **Kidney Int.**, New York, v.55, n.5, p.2021-2029, May 1999.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of endocrine pancreas. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.;

GILMAN, A.Z. **Goodman & Gilman's, the pharmacological basis of therapeutics.** 9th. New York: McGraw-Hill, 1996. p.1503.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. The role of glimepiride in the effective management of Type 2 diabetes. **J. Diabetes Complications**, New York, v.18, n.6, p.367-376, Dec. 2004.

DENNISON, D.K.; VAN DYKE, T.E. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. **Periodontol.** **2000**, Copenhagen, v.14, p.54-78, June 1997.

DOXEN, D.L. et al. Diabetes prevents periodontitis-induced increases in gingival platelet derived growth factor-B and interleukin-1 beta in a rat model. **J. Periodontol.**, Chicago, v.69, n.2, p.113-119, Feb. 1998.

EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, New York, v.23, suppl.1, p.S4-S19, Jan. 2000.

FELIG, P. et al. Endocrinology and metabolism. In: _____. **The endocrine pancreas: diabetes mellitus.** 3. rd. New York: Macgraw-Hill., 1995. Cap.19, p.1107-1250.

FISCHER, L.J. et al. Intracellular multiplication and toxic destruction of cultured macrophages by *Capnocytophaga canimorsus*. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, n.9, p.3484-3490, Sept. 1995.

GONZALES, J.; FEVERY, J. Spontaneously diabetic biobreeding rats and impairment of bile acid-independent bile flow and increased biliary bilirubin, calcium and lipid secretion. **Hepatology**, Baltimore, v.16, n.2, p.426-432, Aug. 1992.

GOODMAN, W.G.; HORI, M. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. **Diabetes**, New York, v.33, n.9, p.825-831, Sept. 1984.

GOODNER, C.J. et al. Accelerated cholesteryl ester transfer in baboons with insulin-requiring diabetes mellitus. **Horm. Metab. Res.**, Stuttgart, v.27, n.2, p.70-75, Feb. 1995.

GRANDINI, S. A The effect of partial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction: histologic study in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.45, n.2, p.190-199, Feb. 1978.

GROSSI, S.C. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evident and need for future research. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.6, n.1, p.138-145, Dec. 2001.

GROSSI, S.G. et al. Assessment for risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. **J. Periodontol.**, Chicago, v.65, n.3, p.260-267, Mar. 1994.

GROSSI, S.G.; GENCO, R.J. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.3, n.1, p.51-61, July 1998.

GUNCZLER, P. et al. Decreased bone mineral density and bone formation markers shortly after diagnosis of clinical type 1 diabetes mellitus. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, London, v.14, n.5, p.525-528, May 2001.

HOLZHAUSEN, M. et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, n.9, p.1030-36, Sept. 2002.

HOLZHAUSEN, M. et al. E. The influence of short-term diabetes mellitus and insulina therapy on alveolar bone loss in rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.39, n.3, p.188-193, June 2004.

HOLZHAUSEN, M.; SPOLIDORIO, L.C.; VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor-2 (PAR2) agonist causes periodontitis in rats. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.84, n.2, p.154-159, Feb. 2005.

HOUGH, S. et al. Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. **Endocrinology**, Springfield, v.108, n.6, p.2228-2234, June 1981.

IACOPINO, A.M. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair throught alteration of macrophage phenotype function. **Oral Dis.**, Houndmills, v.1, n.4, p.214-229, Dec. 1995.

IACOPINO, A.M. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.6, n.1, p.125-137, Dec. 2001.

JANSSON, L.; SANDLER, S. Alloxan, but not streptozotocin, increased blood perfusion of pancreatic islets in rats. **Am. J. Physiol.**, Washington, v.263, n.1 pt.1, p.E57-63, July 1992.

JEFFCOAT, M.K. et al. Efficacy of quantitative digital subtraction radiography using radiographs exposed multicenter trial. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.31, n.3, p.157-160, Apr. 1996.

JOHNSON, I.H. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontum of the rat. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.10, n.6, p.332-345, Dec. 1975.

KARJALAINEN, K.M.; KNUUTTILA, M.L. E. The on-set of diabetes and poor metabolic control increase gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, n.12, p.1060-1067, Dec. 1996.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol.**, Chicago, v.62, n.1, p.59-73, Jan. 1991.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.95, n.6, p.2131-2138, June 1968.

KOYAMA, I. et al. Reduce alkaline phosphatase activity in diabetic rat bone? A re-evaluation. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.121, n.4, p.417-423, Dec. 1998.

LALLA, E. et al. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.3, n.1, p.13-19, July 1998.

LALLA, E. et al. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 23, p.50-62, June 2000.

LASSILA, V.; VIRTANEN, P. Impact of streptozotocin-induced diabetes on rat blood and alveolar bone affected by occlusal stress. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.97, n.3, p.216-221, June 1989.

LISKMANN, S. et al. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.15, n.5, p.546-552, Oct. 2004.

LÖE, H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care.**, New York, v.16, n.1, p.329-334, Jan. 1993.

LÖE, H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, apud DOXEY, D.L. et al. Diabetes prevent periodontitis-induced increased in gingival platelet-derived growth factor-B and interleukin 1-beta in a rat model. **J. Periodontol.**, Chicago, v.69, n.2, p.113-119, Feb. 1998.

McMILLAN, M.D. Oral changes following tooth extraction in normal and alloxan diabetic rats. Part I: macroscopic observations. **N. Z. Dent. J.**, Dunedin, v.66, n.305, p.239-247, July 1970.

McMILLAN, M.D. Oral changes following tooth extraction in normal and alloxan diabetic rats. Part II: Microscopic observations. **N. Z. Dent. J.**, Dunedin, v.67, n.307, p.23-31, Jan.1971.

MISHIMA, N. et al. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.47, n.12, p.843-849, Dec. 2002.

MISAWA, S. et al. Hyperglycemia alters refractory periods in human diabetic neuropathy. **Clin. Neurophysiol.**, Amsterdam, v.115, n.11, p.2525-2529, Nov. 2004.

MURATA, M. et al. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.57, n.8, p.881-887, Apr. 1999.

NASSAR, C.A. et al. Avaliação radiográfica do efeito da ciclosporina-A no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.29, n.2, p.183-193, jul/dez. 2000.

NASSAR, C.A. et al. Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, , São Paulo, v.32, n.2, p.125-130, jul/dez. 2003.

NASSAR, P.O. et al. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in rat periodontitis model. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.39, n.3, p.143-148, June 2004.

NISHIMURA, F. et al. Glucose-mediated alteration of cellular function in human periodontal ligament cells. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.75, n.9, p.1664-1671, Sept. 1996.

NISHIMURA, F. et al. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. **Ann. Periodontol.**, Copenhagen, v.3, n.1, p.20-29, July 1998.

NOVAES Jr., A.B. et al. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. A 10-year follow-up study. **J. Periodontol.**, Chicago, v.68, n.4, p.328-334, Apr. 1997.

NYMAN, S. et al. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. **J. Periodontol.**, Chicago, v.50, n.9, p.450-461, Sept. 1979.

OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann. Periodontol.**, Copenhagen, v. 1, n.1, p. 821-878, Nov. 1996.

OHGI, S.; JOHNSON, P.W. Glucose modulates growth of gingival fibroblasts and periodontal ligaments cells: correlation with expression of basic fibroblast growth factor. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.31, n.8, p.579-588, Nov. 1996.

ORTMAN, L.F. et al. Subtraction radiography and computer assisted densitometric analyses of standardized radiographs. A comparison study with

1251 absorptiometry. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.20, n.6, p.644-651, Nov. 1985.

OWEN, T.A. et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*; reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoclast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, v.143, n.3, p.420-430, June 1990.

PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. **Periodontitis in man other animals**. Basel: Karger, 1982. p.71-106.

PAQUETTE, D.W. et al. Enantiospecific inhibition of ligature-induced periodontitis in beagles with topical(S)-ketoprofen. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.24, n.8, p.521-528, Aug. 1997.

PEPATO, M.T. et al. Assessment of the antidiabetic activity of Myrcia Uniflora extracts in Streptozotocin diabetic rats. **Diabetes Res.**, Edinburgh v.22, n.2, p.49-57, 1993.

PEPATO, M.T. et al. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. **Am. J. Physiol.**, Washington, v.271, n.2 pt.1, p.E340-47, Aug. 1996.

PEPATO, M.T. et al. Effect of oral vanadyl sulfate treatment on serum enzymes and lipids of streptozotocin diabetic young rats. **Mol. Cell. Biochem.**, The Hague, v.198, n.1-2, p.157-161, Aug. 1999.

PEPATO, M.T. et al. Anti diabetic activity of Bauhinia forficata decoction in streptozotocin diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.81, n.2, p191-197, July 2002.

REDDY, M.S. The use of periodontal probes and radiographs in clinical trials of diagnosis tests. **Ann. Periodontol.**, Copenhagen, v.2, n.1, p.113-122, Mar. 1997.

REPORT OF EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. **Diabetes Care**, New York, v.26, suppl. 1, p.S5-S20, Jan. 2003.

ROBBINS, M.J. et al. Protection against streptozotocin – induced diabetes by superoxide dismutase. **Diabetologia**, Berlin, v.18, n.1, p.55-58, Jan. 1980.

SALLAY, K. et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.17, n.3, p.263-274, May 1982.

SALVI, G. E.; BECK, J.D.; OFFENBACHER, S. PGE₂, IL-1 β , and TNF- α , Responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. **Ann. Periodontol.**, Copenhagen, v.3, n.1, p.40-50, July 1998.

SCOTT, F.W. et al. Serum enzymes in the BB rat before and after onset of the overt diabetic syndrome. **Clin. Biochem.**, Baltimore, v.17, n.4, p.270-275, Aug. 1984.

SEPÄLÄ, B.; AINAMO, J. Dark field microscopy of the subgingival microflora in insuline-dependent diabetics. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, n.2, p.63-67, Feb. 1996.

SEPÄLÄ, B. et al. Morphometric analysis of cellular and vascular changes in gingival connective tissue in long-term insulin-dependent diabetes. **J. Periodontol.**, Chicago, v.68, n.12, p.1237-1245, Dec. 1997.

SOSKOLNE, W.A.; KLINGER, A. The relationship between periodontal diseases and diabetes:anoverview. **Ann. Periodontol.**, Copenhagen, v.6, n.1, p.91-98, Dec. 2001.

SOLIDORIO, L.C. **Avaliação morfométrica e/ou estereométrica da gengiva marginal, processo alveolar e cemento de ratos tratados com ciclosporina.** 2003. 215f. Tese (Livre-Docente–Patologia) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

TAYLOR, G.W. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **J. Periodontol.**, Chicago, v.69, n.1, p.76-83, Jan. 1998.

TEPPERMAN, J.; TEPPERMAN, H.M. (Eds.). Endocrine function of the pancreas. In: _____. **Metabolic and endocrine physiology.** 4th. Chicago: Ybmp, 1987. Cap.14, p.249-295.

WEI, P.F. et al. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.39, n.5, p.287-293, Oct. 2004.

WILSON, Jr.; THOMAS, G. **Fundamentos de periodontia.** São Paulo: Quintessense, 2001. 564p.

WONG, M.M. et al. Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v.5, n.8, p.803-813, Aug. 1990.

YAMALIK, N. et al. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. **J. Periodontol.**, Chicago, v.71, n.3, p.460-467, Mar. 2000.

YAMAMOTO, H. et al. Enhanced proteolytic activity directed against the N-terminal of IGF-I in diabetic rats. **J. Endocrinol.**, v.162, n.2, p.243-250, Aug. 1999.

ZAMBON, J.J. et al. Microbiological and immunological studies of adults periodontitis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Periodontol.**, Chicago, v.59, n.1, p.23-31, Jan. 1988.

ZIPFEL, M. et al. Evidence for the activation of mieloperoxidase by f-meth-leu-phe prior to its release from neutrophil granulocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.232, n.1, p.209-212, Mar. 1997.

Anexos

ANEXO 2

Peso corporal

Tabela A1 - Peso corporal no dia da Indução do diabetes (dia-3) dos grupos estudados nos períodos experimentais (média ± DP)

Grupos	Períodos			
	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	132±13.1 ^a	136±12.2 ^a	127.3±19.7 ^a	133±18.2 ^a
II	137.1±19.3 ^b	143±14.6 ^b	139±11.3 ^b	130±16.9 ^b
III	135±8.1 ^c	140±13.8 ^c	143.3±16.9 ^c	131±14 ^c
IV	136±13.2 ^d	144±10.2 ^d	137.1±2.8 ^d	135±14.9 ^d

^a Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos em cada período correspondente, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

Tabela A2 - Peso corporal no dia de confirmação do estado diabético (dia-1) dos grupos estudados nos períodos experimentais (média ± DP)

Grupos	Períodos			
	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	158±16.7 ^a	161.4±15.3 ^a	157.3±21.7 ^a	150.1±19.9 ^a
II	148±27.1 ^b	153.2±12.9 ^b	147.1±22.3 ^b	136.1±9.4 ^b
III	163.1±11.5 ^c	164.8±14.7 ^c	173±23 ^c	153.1±14.5 ^c
IV	150.4±16.9 ^d	149.2±10.3 ^d	148.5±6.3 ^d	143.3±21.8 ^d

^a Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

*Diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos em cada período correspondente, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

ANEXO 3***Níveis glicêmicos dos animais não-diabéticos***

Tabela A3 - Valores de glicemia (média \pm DP) no dia de confirmação do estado diabético e no dia do sacrifício dos grupos não diabéticos (I e III) nos períodos experimentais

Grupos	Fase Experimental	Períodos			
		3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
Grupo I	Glicemia	165 \pm 12.7*	146 \pm 13.9	129 \pm 8.4	158 \pm 13.4
	Sacrifício	138.3 \pm 14.8	140.2 \pm 13.9	143.4 \pm 43.6	155.4 \pm 17.5
Grupo III	Glicemia	160.7 \pm 7.3*	145 \pm 20.8	122.4 \pm 9.1	162.1 \pm 19.6
	Sacrifício	139 \pm 15.3	135.1 \pm 10.2	139 \pm 15.3	149 \pm 21.9

*Diferença estatisticamente significativa em relação às fases experimentais (glicemia e sacrifício) em cada grupo e período correspondente, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

Glicemia – Glicemia no dia da confirmação do estado diabético

Sacrifício – Glicemia no dia do Sacrifício

ANEXO 4***Concentração sérica de ALP nos períodos e fases estudados***

Na Tabela A4 pode-se observar que durante o experimento independente do período estudado, a concentração sérica de fosfatase alcalina oscilou consideravelmente, mas não seguiu um padrão definido.

Tabela A4 - Concentração sérica de fosfatase alcalina em U/dL (média±DP) nos períodos e fases experimentais estudados

Grupos	Fase Experimental	Períodos			
		3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
Grupo I	Glicemia	418.3±322.5	313.4±103	351.5±83.3	303.9±46.1
	Sacrifício	237.7±39.5	268.1±60.3	236.4±58.7	427.4±332.9
Grupo II	Glicemia	557.7±190.6	490±162.5	556.5±87.8	465.4±157
	Sacrifício	844.6±524.5	779.9±518.6	410.5±213.5	818±495
Grupo III	Glicemia	468±381.7	278.4±89.2	273.9±16.4	300.6±84.6
	Sacrifício	226.6±37.1	238.8±43.6	155.5±19.6	359.7±232.4
Grupo IV	Glicemia	667.4±423.3	450.1±128.2	849.2±345.7	598.7±216.6
	Sacrifício	647.2±270.8	546.5±148.1	641±115	1414.9±1409.1

Glicemia – Nível sérico de fosfatase alcalina no dia da confirmação do estado diabético

Sacrifício – Nível sérico de fosfatase alcalina no dia do Sacrifício

Resumo

GOMES, D.A.S. Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos. Análise bioquímica, macroscópica, radiográfica e dos níveis de mieloperoxidase. Araraquara, 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Evidências sugerem existir correlação positiva entre diabetes mellitus e destruição periodontal. Com intuito de estudar a influência do Diabetes Mellitus sobre a evolução da doença periodontal induzida, o presente estudo apresenta como objetivos, avaliar o peso corporal, os níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, os níveis teciduais de mieloperoxidase, além de, análise macroscópica e radiográfica dos espécimes de cada animal. Foram utilizados 128 ratos machos Wistar divididos em 4 grupos de 32 ratos, sendo: Grupo I controle; Grupo II diabético; Grupo III controle com doença periodontal induzida e Grupo IV diabético com doença periodontal induzida. Após dois dias da confirmação do estado diabético induzido por estreptozotocina, foi realizada a colocação da ligadura. Oito animais de cada grupo foram sacrificados nos períodos experimentais de 3, 7, 15 e 30 dias após colocação da ligadura. Os resultados demonstraram que o estado diabético perdurou até o final do experimento nos grupos II e IV. Dentre os marcadores bioquímicos, somente a ALP apresentou-se estatisticamente maior nos grupos diabéticos (II e IV). Macroscopicamente, houve diferença somente entre os grupos com e sem doença periodontal, independente da presença do diabetes, com maior alteração tecidual nos

períodos tardios de periodontite (30 dias). Os níveis gengivais de MPO foram estatisticamente maiores ($p < 0.05$) nos grupos com doença periodontal induzida (III e IV). Radiograficamente, o grupo IV apresentou maior perda óssea estatisticamente significativa quando comparada aos demais grupos ($p < 0,05$). Nos limites deste estudo, pode-se concluir que a doença periodontal induzida não alterou o estado hiperglicêmico, no entanto, sugere-se que o diabetes acentue a severidade da perda óssea alveolar no processo evolutivo da doença periodontal, entretanto, tal fato ainda precisa ser esclarecido.

Palavras chaves: doenças periodontais, diabetes mellitus, radiografia, peroxidase, ratos.

Abstract

GOMES, D. A. S. Influence of Diabetes Mellitus on the progression of periodontal disease induced in rats. Biochemical, macroscopic, radiographic and mieloperoxidase level assessment. Araraquara, 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Evidences suggest the existence of a positive correlation between diabetes mellitus and periodontal collapse. In order to evaluate the influence of Diabetes Mellitus on the progression of periodontal disease induced in rats, the objective of the present study was to verify glycemic, calcium, phosphorus and alkaline phosphatase serum levels, to evaluate myeloperoxidase (MPO) gingival levels, as well as to carry out macroscopic and radiographic assessment of the animals' hemimandíbulas of experimental periodontitis. A hundred twenty-eight Wistar male rats were used in this study. They were divided into 4 groups of 32 rats each, as follows: Group I – control; Group II – diabetic; Group III – control with periodontal disease induced; and Group IV – diabetic with periodontal disease induced. After streptozotocin diabetic state was confirmed, a ligature was placed on the mandibular first molar teeth of Groups III and IV rats. Eight animals of each group were killed at the experimental periods of 3, 7, 15 and 30 days after the ligature placement. Results demonstrated that the diabetic state lasted up to the end of the experiment at groups II and IV. Significant increases in serum alkaline phosphatase were observed at diabetic groups (II and IV). Macroscopically, in the groups where periodontal disease was induced, it was possible to observe more tissue alterations and it was higher in the 30-day experimental period. The MPO levels were significantly higher in induced periodontitis groups (III and IV) ($p < 0.05$).

Radiographically, diabetic with experimental periodontitis group (IV) showed statistically higher bone loss in all the experimental periods ($p < 0.05$). It is possible to conclude that induced periodontal disease did not change the diabetic state, however, diabetes enhanced the severity of bone loss in the progressive process of periodontal disease but this fact still remains to be established.

Keywords: periodontal diseases, diabetes mellitus, radiography, peroxidase, rats.