

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

EDUARDO JOSÉ CALDEIRA

200329863

**EFEITOS DO DIABETES ESPONTÂNEO SOBRE A
MUCOSA BUCAL DE CAMUNDONGOS (NOD)**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Eduardo José Caldeira</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Celular e Estrutural na área de
Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	C127e
V	EX
TOMBO BCI	55584
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00188604-3
BIB ID 300668

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C127e Caldeira, Eduardo José
Efeitos do diabetes espontâneo sobre a mucosa bucal de camundongos
(NOD) / Eduardo José Caldeira. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

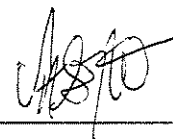
Orientadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Mucosa bucal. 2. Estereologia. 3. Diabetes Mellitus. I. Quitete, Valéria
Helena Alves Cagnon. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Campinas, 16 de Julho de 2003

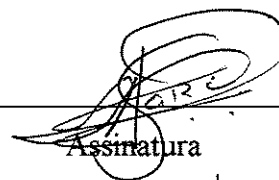
BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete
(Orientadora)



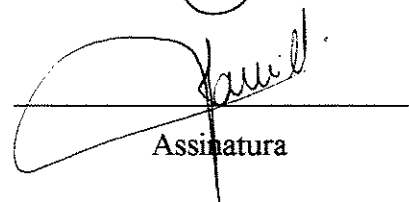
Assinatura

Prof. Dr. Progresso José Garcia



Assinatura

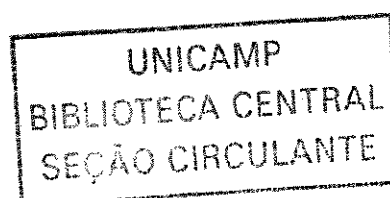
Prof. Dr. José Angelo Camilli



Assinatura

Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line

Assinatura



DEDICATÓRIA À DEUS...

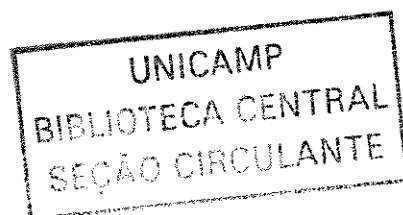
“Porque tu és a minha rocha e a minha fortaleza, pelo que, por amor do teu nome, guia-me e encaminha-me.” (Salmo 31:3)

AOS MEUS PAIS, JOSÉ JULIO E MERCEDES

“Pelo amor único e infinito; fraterno, amigo e confidente que sempre zela e se oferece por inteiro.”

À ELAINE

“Você é assim, é tudo para mim e quando eu não te vejo. Eu penso em você, desde o amanhecer até que me deito... Teus olhos meu clarão, me guiam pela escuridão, teus pés me abrem o caminho e assim eu nunca me sinto só...” (Marisa Monte; Arnaldo Antunes; Davi Moraes, Pedro Baby, Carlinhos Brown)



AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, mestre exemplar e amiga, pela confiança e por ter dirigido meus **sonhos**, visando meu aprimoramento didático e científico. Muito obrigado.

Aos Mestres **Prof. Dr. Antônio de Castro Rodrigues** e ao **Prof. Dr. Progresso José Garcia**, por acreditar. Muito obrigado.

À Prof^a Dr^a Shirlei Maria Recco Pimentel e a todos do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À Prof^a Dr^a Iara Maria Silva de Luca, pelas orientações durante a realização das análises estereológicas.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani**, pelo auxílio na execução da análise estatística.

À Prof^a Dr^a Maria Alice da Cruz Höfling, **à Prof^a Dr^a Evanisi Teresa Palomari** e ao **Prof. Dr. José Meciano Filho** pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. José Angelo Camilli, ao Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line e ao Prof. Dr. Progresso José Garcia pelas correções, indicações e lapidação deste trabalho, durante a pré-banca examinadora.

Às Sras. Lilian Alves Senne Panagio, Silvia Helena Burghi Kalaf, Ana Floriano Rodrigues e Lourdes Pinheiro, pela atenção que me dispensaram durante todo o Mestrado.

Aos Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula, pela disposição em ajudar durante a parte experimental deste trabalho.

À Sra. Marlene Lima Francisco, pela manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

Aos Srs. Paulo Afonso Bernardes, Carlos Roberto Gonçalves e Paulo Francisco dos Santos, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Ricardo Noboro, Marcelo Cunha, Carlos Salto Neto e José Ferreira Santiago, pela amizade e apoio.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, por ensinarem um pouco mais sobre a convivência em grupo.

À **CNPq** e **Faep/Unicamp** pela concessão de bolsa e auxílio, o que tornou possível à execução e finalização deste trabalho.

“Quando alguém a podou, a roseira chorou. Mas depois se vingou. Deu mais rosas do que nunca. Ninguém nasceu para sofrer!. Mas a dor nos faz crescer.”

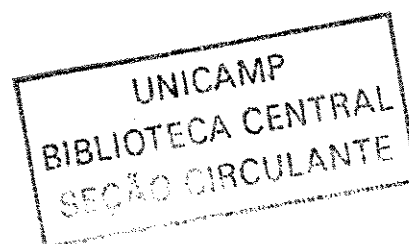
(Autor Desconhecido)

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
I-INTRODUÇÃO.....	01
II-JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	05
III-MATERIAIS E MÉTODOS.....	06
<i>III.1-GRUPOS EXPERIMENTAIS.....</i>	06
<i>III.2-PROCEDIMENTO DE COLETA DAS AMOSTRAS.....</i>	07
<i>III.3-MICROSCOPIA DE LUZ.....</i>	08
<i>III.4-MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....</i>	09
<i>III.5-ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....</i>	10
<i>III.6-ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</i>	11
ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.....	12
<i>ABSTRACT.....</i>	14
<i>INTRODUCTION.....</i>	15
<i>MATERIALS AND METHODS.....</i>	16
<i>RESULTS.....</i>	18
<i>DISCUSSION.....</i>	21
<i>BIBLIOGRAPHY.....</i>	25
<i>FIGURE LEGENDS.....</i>	29
<i>FIGURE 1.....</i>	32
<i>FIGURE 2.....</i>	33
<i>FIGURE 3.....</i>	34
<i>FIGURE 4.....</i>	35
<i>TABLES.....</i>	36
IV-CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES FINAIS.....	37
V-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

O Diabetes Mellitus é um distúrbio crônico que afeta o metabolismo de proteínas, carboidratos e gordura sendo a hiperglicemia a principal característica. A incidência mundial de indivíduos com diabetes vem aumentando nos últimos anos, cerca de 160 milhões de pessoas são diabéticos tendendo a dobrar nos próximos 25 anos (Ritz, 2002). Diversos estudos vem sendo realizados na tentativa de esclarecer os efeitos deletérios do diabetes sobre a mucosa bucal, além da reversão desses através de tratamento e ou dieta. Contudo, dúvidas persistem sobre os efeitos celulares dessa patologia na mucosa bucal. Assim, o presente estudo visa realizar análises histológica, ultra-estrutural e estereológica da mucosa bucal de camundongos espontaneamente diabéticos, correlacionando-as a processos de reparo e susceptibilidade a infecções. No presente estudo foram utilizados 27 camundongos fêmeas divididos em 3 grupos; diariamente realizou-se o monitoramento dos níveis de glicose e caracterizando o estado diabético realizou-se coleta da mucosa bucal com posterior processamento para microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Nos grupos Nod negativo e Nod positivo verificou-se diminuição da espessura epitelial e atipia das células epiteliais. Ultra-estruturalmente, notou-se involução do volume celular, principalmente no estrato basal. Assim conclui-se que o diabetes espontâneo leva a mudanças na biologia básica da mucosa bucal, podendo levar ao comprometimento do reparo tecidual propiciando a ocorrência de infecções bucais.



I-INTRODUÇÃO

I.1-DIABETES – GENERALIDADES

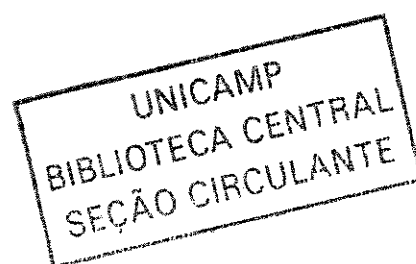
O Diabetes Mellitus é um distúrbio crônico que afeta o metabolismo de proteínas, carboidratos e gordura, resultando em severas desordens metabólicas. A principal característica dessa patologia é a hiperglicemia refletindo uma deficiência na utilização dos carboidratos (glicose), resultado de uma anormalidade na secreção de insulina ou do efeito desta sobre os tecidos (Robbins, 1989; Conget, 2002). O pâncreas é uma glândula, tanto de excreção exócrina como endócrina. A porção endócrina está representada por aproximadamente um milhão de unidades celulares agrupadas denominadas "Ilhotas de Langerhans". Essas ilhotas são agregados de diferentes tipos celulares, das quais 70 % estão representados por células Beta. As células Beta sintetizam e secretam a insulina estimuladas pela concentração de glicose no sangue (Nattras & Halles, 1988). A insulina é um polipeptídeo composto por duas cadeias de aminoácidos, tendo importante papel na regulação de várias patologias do metabolismo, incluindo o de carboidratos, o armazenamento de glicogênio, a síntese de ácidos graxos, o transporte de aminoácidos e a síntese de DNA, RNA e proteínas (Anderson et al., 1994). Porém, quando as células Beta deixam de executar suas funções, seja por fatores hereditários ou relacionados à obesidade, caracteriza-se um quadro patológico denominado Diabetes Mellitus (Byrne, 1996; Guyton & Hall, 1996). Em seres humanos, pode-se classificar o diabetes em duas categorias, tipo I (infanto-juvenil) ou insulino dependente (IDDM), que resulta em severa ou absoluta falta de insulina, além de grande tendência à cetose e o tipo II, ou não dependente de insulina (NIDDM) caracterizado por estabilidade e relativa insensibilidade à insulina, com ausência de cetoses. A incidência de pacientes com este tipo de diabetes vem aumentando espantosamente (Ritz, 2002), sendo a obesidade uma das características marcantes do diabetes tipo II, sendo que esta forma leva a diminuição do número de receptores de insulina nas células alvo, tornando a quantidade de insulina ineficiente (Ellenberg & Rifkin,

1962; Robbins, 1989). É estimado que o diabetes do tipo I manifesta-se aproximadamente em 10% dos pacientes diabéticos do Ocidente (Stefan, 1996). Dados recentes mostram que 8% para cada 100 mil habitantes, entre 30 e 65 anos de idade são portadores desse tipo de diabetes (Ministério da Saúde/Guia de Vigilância Epidemiológica do Brasil, 1998). Nos Estados Unidos, o diabetes é responsável por 2% dos óbitos estando entre as dez doenças que mais matam nesse país. Com taxa anual de cerca de 54,000 óbitos, o diabetes constitui a sétima causa principal de óbitos nos Estados Unidos (Parker et al., 1997). A incidência mundial de pacientes com diabetes vem aumentando nos últimos anos, cerca de 160 milhões de pessoas são diabéticos tendendo a dobrar nos próximos 25 anos (Ritz, 2002). Além disso, é uma doença que debilita os portadores levando-os à várias complicações como: deficiências vasculares, renais, oftálmicas, neurológicas, bem como perda de peso, problemas digestivos, alteração na cicatrização de feridas e a incidência de infecções, normalmente levando o indivíduo ao afastamento das atividades de trabalho (Gomori & Goldner, 1943; Fushini, 1980; Shunk Mei-Ho, 1990; Stefan, 1996). Apesar do conhecimento das várias complicações que o indivíduo diabético apresenta, pouco se sabe sobre a etiologia dessa doença. Esse fato deve-se à vários fatores tais como: os diversos perfis clínicos e subclínicos, a idade com que a doença manifesta-se e a incidência nos diferentes grupos étnicos e geográficos avaliados (Creutzfeld, 1976). Várias tentativas têm sido realizadas para elucidar como, quando, porque e quais os efeitos deletérios nos sistemas orgânicos, além da reversão desses através de tratamento e ou dieta. Assim sendo, a utilização de diferentes espécies animais que apresentem o diabetes, tanto por indução química ou por espontaneidade é comum. Para a indução química do diabetes são utilizadas drogas como a estreptozotocina e a aloxana (Seethalakshmi et al., 1987; Saprykina et al., 1998; Perez et al., 1998; Kovacs et al., 1998; Palomar-Morales, 1998; Lee et al., 1999; Yildirim et al., 1999; Orie & Anyaegbu, 1999; Kavikumar & Anuradha, 1999; Avedano, 1999). Os animais utilizados nesses experimentos são tanto cães como roedores da linhagem C57BL/Ksj homozigotos diabéticos (db/db), o Wistar Chinês (Herberg & Coleman, 1977) e o NOD (diabético não obeso), apresentando os dois últimos síndrome espontânea semelhante ao diabetes humano tipo II e I respectivamente (Makino et al., 1980). Tanto os animais tratados quimicamente, como os espontaneamente diabéticos,

expressam sintomas como: polidipsia, poliúria, polifagia, emaciação e outras complicações semelhantes ao diabetes humano.

1.2-MUCOSA BUCAL

A mucosa bucal tem funções básicas similares às da pele, porém sem desempenhar papel significativo na regulação da temperatura. Contudo, é uma região de importância sensorial durante a mastigação dos alimentos, sendo que as forças geradas pelos alimentos podem perfurar ou abrasionar a mucosa. Assim, o epitélio superficial da mucosa forma uma barreira às várias agressões físicas e químicas (Mjör & Fejerskov, 1990). A mucosa bucal pode ser dividida em mastigatória, de revestimento e especializada. De maneira geral, tanto em seres humanos como em roedores, a cavidade bucal apresenta-se revestida por epitélio estratificado com células pavimentosas, sendo que a interface do epitélio com a lâmina própria é formada pela membrana basal. As glândulas salivares estão presentes nas porções profundas da lâmina própria e na submucosa, sendo que glândulas sebáceas também podem estar presentes. Em seres humanos, a mucosa bucal apresenta dois padrões principais de diferenciação, a queratinização e a não queratinização, já nos roedores evidencia-se apenas o epitélio estratificado escamoso queratinizado, sendo as células epiteliais da camada basal colunares (McMillan, 1979; Martinez et al., 1998; Zorzeto, 1997; Marcondes, 2002). Os quatro estratos histológicos são o basal, o espinhoso, o granuloso e o córneo. Sendo que destas camadas, o primeiro caracteriza o compartimento reprodutivo ou progenitor e os três últimos o compartimento funcional. Ultra-estruturalmente, as células da camada basal apresentam conspicuo retículo endoplasmático granular e complexo de golgi de localização perinuclear, com ribossomos aderidos na sua membrana. O núcleo das células basais são arredondados ou ovais, com invaginações do envelope nuclear (Hamilton & Blackwood, 1977; Mjör & Fejerskov, 1990; Junqueira & Carneiro, 1995).



1.3-DIABETES E MUCOSA BUCAL

A relação entre o diabetes mellitus e a mucosa bucal, em especial, a ocorrência da doença periodontal tem sido estudada tanto experimentalmente como na clínica. Em 1974, um estudo mostrou a reação inflamatória periodontal em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/KSJ-db, que quando homozigotos expressavam o diabetes. Os autores caracterizaram gengivite, espessamento do epitélio na região sulcular, bem como ruptura do ligamento periodontal, além de reabsorção óssea (Elgeneidy et al., 1974). Ratos diabéticos induzidos quimicamente pela aloxana foram analisados e demonstrou-se diminuição na taxa de proliferação celular da mucosa bucal (Hamilton & Blackwood, 1977). Outra análise avaliou o efeito do diabetes no metabolismo do colágeno gengival demonstrando aumento da atividade da enzima collagenase em ratos diabéticos, induzidos quimicamente pela estreptozotocina (Ramamurthy & Golub, 1983). Correlacionou-se também, o efeito prolongado do diabetes em ratos induzidos quimicamente pela aloxana, com a ocorrência de cárie e doença periodontal através de análises histológicas e bacteriológicas. Esses autores verificaram intensa ocorrência destas lesões, além de significativo aumento de lactobacilos na flora da mucosa bucal dos animais diabéticos (Reuterving et al., 1986). Em 1996, experimento utilizando ratos diabéticos por administração de estreptozotocina, demonstrou a degeneração de fibras nervosas no tecido gengival desses animais (Györfi et al., 1996). Também, foi analisado importante redução na proliferação celular das células basais da mucosa bucal de ratos, induzidos ao diabetes quimicamente através da estreptozotocina (Shirai et al., 1998). Posteriormente, outro estudo com ratos também diabéticos por estreptozotocina, sugeriram importante diminuição na tolerância dos tecidos de suporte gengival quando submetidos à pressão mecânica contínua (Mori et al., 1999). Semelhante estudo, verificou a aceleração de fragmentação de DNA epitelial em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Os autores observaram uma prematura fragmentação do DNA no epitélio mastigatório quando submetido a pressão (Maruo et al., 2001). Da mesma maneira estudos relacionando o diabetes com a cavidade bucal têm sido realizados em seres humanos. Hove & Stallard (1970), investigaram a relação do diabetes com o periodonto em pacientes de ambos os gêneros, com idade e grau sócio-econômico

equivalentes, constatando aumento de doença periodontal e processo inflamatório crônico além de mudanças vasculares periodontais. Frantzis (1971), avaliou ultra-estruturalmente os capilares da membrana basal em pacientes diabéticos com doença periodontal. Vinte e quatro pacientes divididos em 3 grupos, sendo esses: 1) com 8 pacientes não diabéticos, livres de doença periodontal com média de idade de 31,7 anos, 2) 8 pacientes não diabéticos, com doença periodontal e idade média de 49,5 anos e 3) 8 pacientes, com ocorrência de doença periodontal e diabetes, com média de 46,1 anos de idade. Os resultados demonstraram que nos pacientes diabéticos os capilares da membrana basal exibiam aumento da espessura da parede do vaso. Também foi avaliado a espessura da membrana basal de pacientes diabéticos, dos gêneros feminino e masculino na faixa etária de 14 à 54 anos, com ou sem inflamação gengival. Os autores mostraram aumento da espessura da lâmina basal, contudo a morfologia dos vasos sanguíneos não apresentaram mudanças, especialmente relacionadas a espessura da parede (Listgarten et al., 1974). Em outro estudo, após avaliarem pacientes comprovadamente diabéticos (IDDM), constataram alta prevalência de lesões bucais, gengivite e periodontite (Cianciola et al., 1982; Guggenheimer et al., 2000). Em 1984, foram avaliados 45 pacientes diabéticos (21 masculinos e 24 femininos) com idade de 10 à 18 anos, sendo essa população razoavelmente homogênea, e não demonstraram periodontite. Segundo esses autores, embora os trabalhos sugiram aumento da frequência da doença periodontal em pacientes jovens com IDDM, é inapropriado generalizar a extensão do problema, mostrando que esta relação não está ainda bem elucidada (Barnett et al., 1984).

II- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Estudos clínicos e experimentais vêm demonstrando que o diabetes mellitus altera o processo fisiológico nos tecidos, os quais podem ser relevantes para a patogênese de doenças da mucosa da cavidade bucal. Contudo, os trabalhos apresentam metodologias divergentes, provavelmente devido à diversidade de metodologias empregadas relacionadas à heterogeneidade amostral, controle de consumo calórico, tempo do diabetes, faixa etária e

avaliação detalhada do comprometimento celular. Assim, uma análise estrutural e ultra-estrutural visando demonstrar as alterações teciduais da mucosa bucal se faz necessária, bem como as correlações envolvendo a morfologia da mucosa com processos de reparo e infecção.

Isto posto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos deletérios do diabetes mellitus sobre os aspectos microscópicos e ultra-estruturais associados à parâmetros estereológicos da mucosa jugal de camundongos espontaneamente diabéticos.

III-MATERIAIS E MÉTODOS

III.1- GRUPOS EXPERIMENTAIS

No presente estudo foram utilizados 27 camundongos fêmeas, sendo 9 camundongos Nod diabéticos positivos (grupo I), 9 camundongos Nod negativos (grupo II) e 9 camundongos BALB/C (grupo III) na faixa etária de 12 à 18 semanas, pesando em média 22 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo/Unicamp. Os animais dos grupos II e III foram controles negativos do grupo I, comprovadamente diabético. Nos animais pertencentes aos três grupos realizou-se monitoramento diário da urina onde foi avaliado os níveis de glicose (mg/dl), proteína (mg/dl) e o pH. A urina desses animais foi coletada através de compressão manual na região da bexiga urinária, desprezando-se a primeira gota. À seguir, o concentrado de urina foi colocado em contato com a fita reagente (MultistiK 10 SG Bayer). A leitura do resultado se realizou após trinta segundos à aplicação dessa fita reagente, relacionando-se com a tabela fornecida pelo fabricante para as mensurações dos níveis dos elementos citados acima. Todos os animais receberam como dieta sólida ração Purina® na forma de grãos e água *ad-libitum*. Ao longo do período experimental foram realizadas mensurações dos consumos de líquido e sólido nos animais dos três grupos. Os pesos corpóreos (g) dos animais foram verificados no início e no final do experimento.

III.2- PROCEDIMENTO DE COLETA DAS AMOSTRAS

Após 20 dias da caracterização do estado diabético, nos animais do grupo I (Nod/positivo), os camundongos de todos os grupos foram anestesiados com Francotar/Virbaxil (1:1), na dosagem de 0,25 ml/100gr de peso corpóreo e realizou-se a coleta da mucosa bucal (região jugal). As amostras de mucosa foram retiradas da região jugal através da dissecação com lamina de bisturi cirúrgico n.º 15, tomando como referência à comissura labial, onde realizou-se uma incisão em forma de “V” acompanhando a maxila e a mandíbula com aproximadamente 0,8 cm. (Figura 1A). Os músculos bucinador e masseter não foram removidos. Cada amostra coletada, para análises de microscopias de luz, eletrônica de transmissão e estereológicas, mediu aproximadamente 0,5 cm (Figura 1B). Antecedendo a retirada, a região foi fotografada com maquina modelo ZENIT 12 XSL.

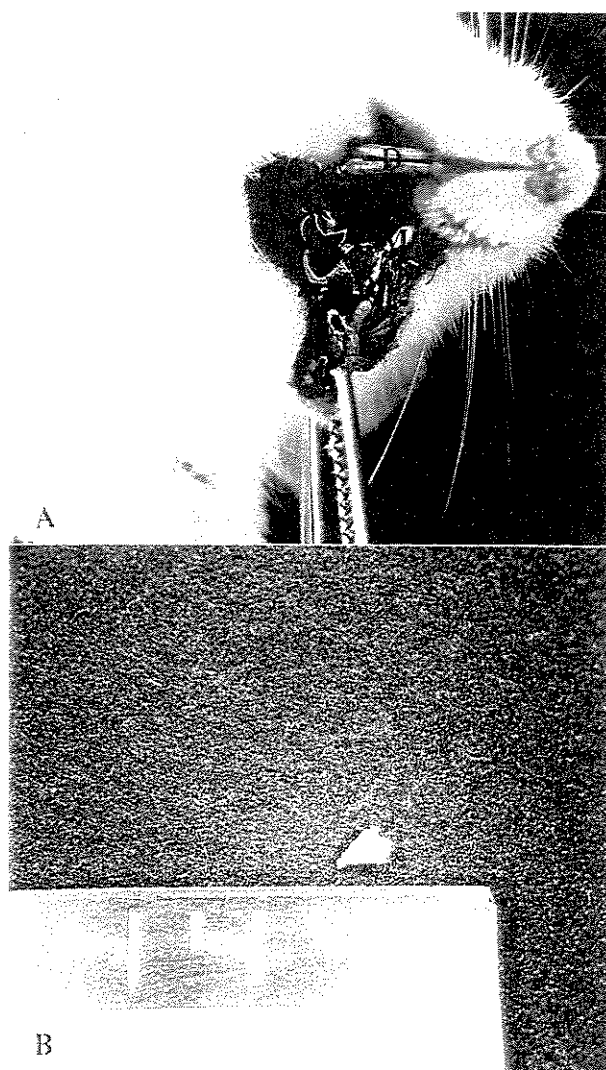


Figura 1 A: Local da coleta na mucosa bucal de camundongos do grupo controle. Observa-se mucosa bucal (MB), comissura labial (CL), masséter (M), dentes (D). **B:** Amostra da mucosa bucal medindo aproximadamente 0,5 cm. x 5.

III.3- MICROSCOPIA DE LUZ

As amostras de mucosa bucal foram coletadas de quatro animais de cada grupo e fixadas em Bouin (Solução aquosa saturada de ácido pícrico- 75 ml, formol- 25 ml, ácido

acético glacial- 5 ml) por 12 horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em água corrente por 30 minutos e a seguir, sofreram desidratação em uma série crescente de álcoois (álcool 80% - 2 vezes, álcool absoluto - 3 vezes; 1 a 2 horas cada). Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol durante 1 a 2 horas até que se tornem translúcidos. Os fragmentos foram incluídos em Paraplast Plus a 56^o C, em estufa por aproximadamente 1 hora. A inclusão foi realizada em formas plásticas. Os tecidos foram orientados e posicionados cuidadosamente no fundo das formas, visando à obtenção dos cortes histológicos transversais. Os blocos foram aparados, de modo a ter superfícies planas e paralelas para poderem ser fixados no micrótomo. A espessura dos cortes obtidos foi de cinco micrômetros. A seguir, os fragmentos foram colocados sobre as lâminas albuminizadas e levadas para estufa a 60^o C. Posteriormente, o material processado foi corado com hematoxilina/eosina e fotografado no fotomicroscópio Axioskop Zeiss em objetivas de 100 x, usando-se filmes KodaK Tmax de 135 mm, ASA 100.

III.4- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os cinco animais remanescentes de cada grupo destinados ao estudo ultra-estrutural foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina heparinizada com posterior fixação em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). A mucosa bucal foi coletada e fragmentada, com aproximadamente 5mm de espessura. Posteriormente, os fragmentos foram submetidos ao complemento da fixação por imersão no mesmo fixador por 12 horas e pós fixados em tetróxido de ósmio a 1 % em tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,4 por duas horas. Na sequência, os fragmentos foram lavados em água destilada e contrastados com acetato de uranila a 0,5 % em solução aquosa de sacarose por 12 horas posteriormente, os fragmentos foram desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Polyscience). Os blocos foram cortados em um ultramicrotomo LKB 8800 ultratome III com 0,5 a 0,8 micrometros de espessura. Os cortes semifinos foram realizados com navalha de vidro, montados em lâminas e corados com azul de toluidina a 1 %, para escolha da região desejada. Finalizando, fez-se cortes ultrafinos os quais foram montados em telas de cobre de 200 mesh e pós-contrastados com acetato de uranila (Reynolds, 1963)

e citrato de chumbo (Watson, 1958). Posteriormente, foram examinados e fotografados em um microscópio eletrônico de transmissão LEO – 906 (Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp).

III.5- ANÁLISE ESTEREOLÓGICA EM MICROSCOPIA DE LUZ

Para o estudo morfométrico foram utilizados 4 animais de cada grupo experimental, (Camundongos NOD diabéticos positivos – Grupo I, Camundongos NOD não diabéticos – Grupo II, Camundongos BALB/C – Grupo III), onde foram quantificados os volumes citoplasmático e nuclear das células da camada basal da mucosa bucal. As secções da mucosa bucal da região jugal foram provenientes dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. Para a quantificação do volume nuclear foram medidos os diâmetros de 50 núcleos das células basais epiteliais da mucosa bucal, de cada animal, totalizando 200 núcleos em cada grupo estudado. A escolha dos núcleos foi ao acaso, priorizando os limites celulares definidos. As medidas foram realizadas com auxílio de ocular graduada (10 x) acoplada ao microscópio de luz Olympus CBB, fixando-se as observações com a objetiva de 100x. A calibragem da ocular foi realizada através de lâmina Zeiss, com divisões de 0,01 mm (10 nm) para obtenção da unidade em micrômetros. À partir desses valores, foram calculados as médias dos volumes dos núcleos através da seguinte fórmula $V = \frac{4}{3}\pi (d/2)^2 D/2$, sendo “d” diâmetro menor e “D” diâmetro maior. Além disso, foram realizadas medidas para determinação quantitativa das frações de volume (Vv) ocupadas pelo núcleo e pelo citoplasma das células epiteliais basais da mucosa bucal. Essas mensurações foram feitas através de uma ocular 10 x contendo um retículo de integração quadrilátero com 100 pontos acoplados ao microscópio de luz Olympus CBB e objetiva de 100 x. Através desse retículo, foram observados e contados os pontos localizados sobre os núcleos e sobre o citoplasma das células de quatro campos previamente definidos. A fração de volume ocupada pelo núcleo em relação ao citoplasma foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$V_v = p/P$$

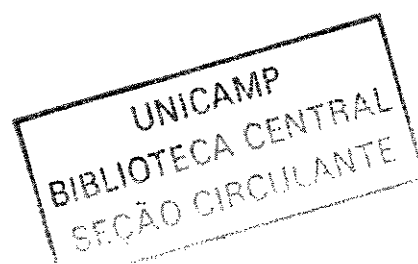
Vv = densidade de volume ou fração de volume (%)

p = numero de pontos sobre o núcleo

P = numero total de pontos ou soma dos pontos sobre os núcleos e citoplasmas nos diferentes campos (Weibel, 1979; Mandarin de Lacerda, 1995).

III.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo estatístico foi realizado para as seguintes variáveis: peso corpóreo inicial (g), peso corpóreo final (g), espessura do epitélio (μm), volume nuclear (μm^3), volume citoplasmático (μm^3), consumo de ração (g) e consumo de líquido (ml), através da técnica de análise de variância (paramétrica e não paramétrica), complementada com o teste de comparações múltiplas envolvendo todos os pares de grupo (Norman & Streiner, 1994). Todo o estudo foi realizado com 1% de significância (Montgomery, 1991).



Artigo submetido à publicação no periódico: Tissue & Cell, 2003

“Effects of spontaneous diabetes on the oral mucosa of Nod mice.”

Eduardo José Caldeira¹, Valéria Helena Alves Cagnon^{*1}

¹Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas- UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

*Correspondence to: Dr. Valeria H. A. Cagnon, Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas, São Paulo, Brazil. Telephone: (55) 19 3788 6102. Fax (55) 19 32893124. E-mail: quitete@uol.com.br

ABSTRACT

Several studies have been carried out in an attempt to establish the deleterious effects of diabetes on the oral mucosa, as well as to reverse these effects through treatment or diet. However, doubts regarding morphological alterations remain. Thus, the present study aims to perform histological, ultrastructural and stereological analyses of the oral mucosa in spontaneously diabetic mice and correlated the findings with the processes of tissue repair, healing and susceptibility to infection. Twenty-seven female mice were divided into three experimental groups: control, nondiabetic Nod and diabetic Nod animals. After characterization of diabetic status, through daily monitoring of glucose levels with Bayer MultistiK 10 SG reagent strips, samples were collected from the oral mucosa and processed for light and transmission electron microscopy. Reduced epithelial thickness and atypical epithelial cells mainly in the basal cell layer, accompanied by a marked involution of cell volume, were observed in the diabetic group. It was concluded that spontaneous diabetes leads to alterations in the basic biology of the oral mucosa, compromising tissue function and favoring the occurrence of oral infections.

I-INTRODUCTION

The worldwide incidence of patients with diabetes has shown an amazing increase during the last few years, with about 160 million individuals being diabetic and with this figure tending to double within the next 25 years (Ritz, 2002). In 2002, 8% of the Brazilian population aged 30 to 70 years was estimated to develop diabetes. However, 50% of these individuals are unaware of the disease (Ministério da Saúde, 2002). In the United States, diabetes is responsible for 2% of deaths and is among the ten diseases that most kill in the country, with an annual rate of 54.000 deaths (Parker, 1997). Diabetes mellitus is a chronic disease that affects protein, carbohydrate and fat metabolism, resulting in severe metabolic disorders. The main characteristic of this disease is hyperglycemia, reflecting deficient carbohydrate utilization (glucose), which is the consequence of abnormal insulin secretion or of an abnormal effect of insulin on tissues (Robbins, 1989; Conget, 2002). One manifestation of diabetes mellitus is type I, or insulin-dependent or juvenile, diabetes which develops in approximately 10% of western diabetic patients (Stefan, 1996). This type of diabetes results in severe and absolute insulin deficiency caused by a decline in beta cells. This form becomes more aggressive during puberty, with three interconnected mechanisms being responsible for beta cell destruction: genetic susceptibility, autoimmunity and environmental aggression (Cotran, 2000; Homo-Delarche, 2001). In contrast, obesity is the main characteristic of the other form of diabetes, called type II or non-insulin-dependent diabetes, which leads to a reduction in the number of insulin receptors on target cells and thus to inefficient amounts of insulin (Ellemberg & Rifkin, 1962; Robbins, 1989). Several attempts have been made to elucidate the etiology of diabetes and its deleterious effects on the organic systems, in addition to reversing these effects through treatment or diet. Thus, the utilization of different animal species with chemically induced or spontaneous diabetes has received great attention from researchers. Nod (nonobese diabetic) mice are animals with spontaneous diabetes which develop a form of diabetes that resembles human type I diabetes (Makino et al., 1980), while Wistar Chinese present a disease resembling diabetes type II (Herberg & Coleman, 1977). Other animals used in such experiments are those with chemically induced diabetes such as dogs and other rodents including those of the

homozygous diabetic C57BL/Ksj lineage (db/db). Diabetes is a debilitating disease leading to various complications, including vascular, renal, ophthalmic and neurological deficiencies, weight loss, digestive problems and reproductive deficiencies (Stefan, 1996; Cagnon et al., 2000; Gomes et al., 2002). An association between diabetes mellitus and oral mucosal alterations has also been observed in both experimental studies and clinical practice, including alterations in the healing process of lesions as well as the triggering of infectious processes in the lining mucosa (Gomori & Goldner, 1943, Fushini, 1980; Shunk Mei-Ho, 1990). In addition, studies on alloxan-induced diabetic rats have shown a marked decline in the cell proliferation rate of the oral mucosa, an increase in the lactobacillus flora and the presence of caries and periodontal disease (Hamilton & Blackwood, 1977; Reuterving et al., 1986). Subsequently, another study using streptozotocin-diabetic rats suggested an important reduction in the tolerance of gingival supporting tissues to continuous mechanical pressure (Mori et al., 1999). However, the results of these studies are controversial, probably because of differences in the methods employed, which are related to sample heterogeneity, control of calorie ingestion, duration of diabetes and age group analyzed. The objective of the present study was to determine possible alterations in the histology, ultrastructure and stereological parameters of the oral mucosa of spontaneously diabetic mice, as well as the correlation between these alterations and tissue remodeling and the pathogenesis of diseases related to the mucosa of the oral cavity.

II- MATERIAL AND METHODS

Animals and tissue preparation

A total of 27 female mice (Nod and BALB/c) aged 12 to 18 weeks were divided into three experimental groups: diabetic Nod mice, nondiabetic Nod mice and BALB/c mice (control). Glucose levels (mg/dl) were measured in all three groups with Bayer MultistiK 10 SG reagent strips. Twenty days after the characterization of diabetic status in diabetic Nod mice, all animals were weighed, anesthetized with Francotar/Virbaxil (1:1/0.25 ml/100g body weight) and sacrificed. Samples of the cheek mucosa were then

removed for light and transmission electron microscopic analysis. For light microscopy, mucosa samples obtained from four animals of each group were fixed in Bouin's solution, embedded in plastic resin (Paraplast) and stained with hematoxylin and eosin and photomicrographs were obtained with a Nikon photomicroscope. For transmission electron microscopy, five animals of each group were perfused with Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965). The material was immediately removed, fixed in the same solution for 24 h and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h. Specimens were then dehydrated, embedded in plastic resin (Polyscience), cut into ultrathin sections with an LKB ultramicrotome, and counterstained with uranyl acetate (Watson, 1958) and lead citrate (Reynolds, 1963). The material was examined and photographed under a LEO-906 transmission electron microscope at the Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Biology, Unicamp.

Light microscopy morphometric analysis

Material used for quantitative analysis was obtained from samples of the different experimental groups processed for light microscopy (control, nondiabetic Nod and diabetic Nod mice). The morphometric parameters studied were cytoplasmic and nuclear volumes of the basal cells and epithelial thickness. Cytoplasmic and nuclear volumes were measured using the point counting method of Weibel (1979), with the nuclear volume being determined by measuring the diameter of 50 basal epithelial cell nuclei of the oral mucosa of each animal. Epithelial thickness was determined based on the mean height of four regions in the oral mucosa section using an ocular grid (10 mm/100, Zeiss) coupled to an Olympus CBB microscope equipped with a 100X lens (Weibel, 1979).

Statistical analysis

Body weight variation, solid and fluid ingestion, mean basal cell nuclear and cytoplasmic volume, and epithelial thickness were compared by Tukey's mean comparison

test (Montgomery, 1991), followed by a multiple comparisons test involving all group pairs (Norman & Streiner, 1994). The level of significance was set at 1%.

III-RESULTS

Urine analysis

Glycosuria levels were 0 mg/dl in 100% of the samples obtained from control and nondiabetic animals, while glucose levels were 1000 mg/dl in the diabetic group throughout the 20 days of the study.

Body weight and fluid and solid ingestion

A significant increase in body weight was observed for the control and nondiabetic groups compared to diabetic Nod mice. Food and fluid ingestion was significantly lower in the control and nondiabetic Nod groups than in diabetic Nod mice (Table 1).

Light Microscopy

A 9- μ m thick keratinized stratified squamous epithelium was observed in the oral mucosa of control animals (Table 2), showing the basal, spinosum, granulosum and corneum cell layers with marked epithelial cristae situated above a clear basement membrane (Figure 1A). In the basal cell layer, columnar cells with a centralized nucleus following the major cell axis were observed (Figure 1A and Table 2). Upwards, in the spinosum and granulosum layers cells were voluminous and spherical, respectively, and contained a centralized nucleus. Superficially, flattened cells in the characteristic process of desquamation were identified in the corneum layer (Figure 1A). The lamina propria consisted of smooth muscle cells and different cell types intermingled among connective tissue (Figure 1A). In nondiabetic Nod mice, the keratinized stratified squamous epithelium showed a thickness of 4.3 μ m (Table 2), occasional epithelial cristae and basal cells of

reduced cytoplasmic and nuclear volume and impaired differentiation of the spinosum, granulosum and corneum cell layers (Figure 1B and Table 2). Apparent involution and a decrease in cell number was observed in the spinosum and granulosum cell layers, respectively. Occasional cells in the process of discrete desquamation were noted in the corneum layer (Figure 1B). The lamina propria consisted of smooth muscle cells and different cell types scattered throughout connective tissue (Figure 1B). An atrophic, 2.85- μ m thick keratinized stratified squamous epithelium situated above a basement membrane with occasional epithelial cristae was observed in diabetic Nod mice (Figure 1C and Table 2). Identification of the different cell layers was difficult. In the basal cell layer, pleomorphic cells showing a marked reduction in cytoplasmic and nuclear volume were observed (Figure 1C and Table 2). Upwards, the difficult to characterize spinosum and granulosum cells were apparently involuted and contained a nucleus of diffuse aspect. No corneum cells or the typical superficial desquamation were detected (Figure 1C). The lamina propria consisted of smooth muscle cells containing peripheral nuclei and different cell types throughout connective tissue (Figure 1C).

Transmission electron microscopy

Ultrastructurally, the control group showed a stratified epithelium consisting of basal, spinosum, granulosum and corneum cells. The basal cells were columnar and contained a basal nucleus and a clearly visible nucleolus (Figure 2A and 2B). The chromatin was homogeneously distributed and condensed close to the nuclear membrane (Figure 2B and 2C). Spherical and elongated mitochondria were noted in the basal cell cytoplasm. Rough endoplasmic reticulum was located in the perinuclear region and consisted of flattened and parallel cisternae, with desmosomes being clearly visible (Figure 2B, Inset). The spinosum cells were voluminous and polyhedral with an irregular nucleus showing homogenous distribution of chromatin and a clearly visible nucleolus (Figure 2D). The cytoplasm of these cells contained electron-dense spherical granules, in addition to elongated tonofilaments following the cytoplasmic membrane. Spherical mitochondria and marked rough endoplasmic reticulum were noted in the perinuclear region (Figure 2D). The

granulosum layer was characterized by flattened cells with a centralized nucleus and invagination of the nuclear membrane, in addition to the presence of a clearly visible nucleolus and condensed chromatin close to the nuclear membrane. The cytoplasm contained spherical granules associated with elongated tonofilaments. Spherical mitochondria and marked rough endoplasmic reticulum were observed in the perinuclear region. The cytoplasmic membrane showed indentations, occasional desmosomes and a small intercellular space (Figure 2E). In the corneum layer, flattened cells lacking nuclei or organelles, with ample desquamation were noted (Figure 2F). The lamina propria consisted of connective tissue and transversal and longitudinal collagen fibers (Figure 2C), in addition to a clearly visible basement membrane at the interface with the lining epithelium (Figure 2B). In the nondiabetic Nod group, cellular involution (Table 2) was observed with the nucleus occupying large part of the cytoplasm, in addition to a clearly visible nucleolus and condensed chromatin close to the nuclear membrane (Figure 3C). Spherical mitochondria and marked rough endoplasmic reticulum were clearly visible in the basal region and close to the nuclear membrane (Figure 3B). The presence of lipid droplets in the basal cytoplasm and desmosomes was also noted (Figure 3A and 3B, Inset). The spinosum cells were found to be apparently involuted maintaining a polyhedral shape and containing an irregular nucleus, condensed chromatin close to the nuclear membrane and a poorly visible nucleolus (Figure 3D). The cytoplasm contained small electron-dense spherical granules and the quantity of tonofilaments was apparently reduced. Spherical mitochondria and marked rough endoplasmic reticulum were found scattered within the cytoplasm and in the perinuclear region. An apparent increase in the intercellular space was also noted (Figure 3D). In the granulosum cell layer, cells were found to be apparently involuted with an irregular nucleus occupying large part of the cytoplasm. The cytoplasm contained electron-dense spherical granules associated with elongated tonofilaments and occasional mitochondria (Figure 3E). Superficially, the corneum layer was characterized by extremely flattened cells accompanied by discrete cellular desquamation (Figure 3F). The lamina propria consisted of connective tissue containing transversal and longitudinal fibers (Figure 3A), in addition to a clearly visible basement membrane at the interface with the lining epithelium (Figure 3B). Diabetic Nod mice demonstrated an atypical, markedly involuted

stratified epithelium and lipid droplets scattered among the different layers, i.e., basal, spinosum and granulosum cell layers (Figure 4A and 4D). The basal cell layer was characterized by involuted and pleomorphic cells (Table 2), with an irregular nucleus occupying most of the cytoplasm (Figure 4C). Spherical or elongated mitochondria, as well as rough endoplasmic reticulum containing flattened cisternae located in the perinuclear region were observed in the cytoplasm (Figure 4B, Inset, and 4C). The intercellular space was markedly increased and contained occasional desmosomes (Figure 4B and 4C). The spinosum cell layer was characterized by apparent cellular involution and pleomorphism, with an irregular nucleus occupying most of the cytoplasm (Figure 4D). The cytoplasm contained some tonofilaments and electron-dense granules. Spherical mitochondria were observed in the perinuclear region, while the rough endoplasmic reticulum was absent. The intercellular space was found to be increased (Figure 4D). The granulosum cell layer was apparently reduced, containing extremely flattened cells with an irregular nucleus occupying most of the cytoplasm. The cytoplasm of these cells contained electron-dense spherical granules (Figure 4E). The corneum layer was characterized by extremely flattened cells lacking a nucleus and organelles. Discrete desquamation of the epithelium was observed (Figure 4F). Transversal and longitudinal fibers were noted in the lamina propria (Figure 4B), as well as a clearly visible basement membrane at the interface with the lining epithelium (Figure 4C). Inflammatory process wasn't observed.

IV-DISCUSSION

The results of the present study demonstrated high protein and glucose levels in the urine of spontaneously diabetic mice, as well as a significant loss of body weight even though the animals consumed significantly larger amounts of ration and fluid compared to control. Several investigators have reported similar studies in which non-obese diabetic mice spontaneously presented a syndrome similar to human type I diabetes, with symptoms such as weight loss, polyuria, polyphagia, changes in cell lipid and protein metabolism and high glucose levels in urine (Hunt & Baley, 1961; Hamilton & Blackwood, 1977; Daubresse et al., 1978; Makino et al., 1980; Shirai et al., 1998; Maruo et al., 2001; Conget,

2002). Thus, it can be concluded that the experimental model used here is viable, permitting the characterization of an effective diabetic status and drastic metabolic imbalance, especially, in terms of carbohydrate and protein metabolism. Also, microscopic examination of mice with confirmed diabetes showed atrophy of the oral epithelium with clear cellular pleomorphism, as well as a difficulty in the differentiation of the various cell layers. The cells of the proliferative layer showed significant volumetric involution of both the cytoplasm and nucleus, with clearly visible deformity of the nucleus, scarce numbers of cell organelles, cell membrane disorganization, as well as the accumulation of lipid droplets in the cell cytoplasm. Also, the effectively functional spinosum and granulosum layers showed an apparent decrease in cell numbers, involution of cell organelles, a clearly reduced cytoplasm and nucleus, an increased intercellular space, as well as nuclear irregularity and the presence of lipid droplets dispersed in the cytoplasm. The corneum layer showed extremely flattened cells and slight superficial desquamation. However, it wasn't observed of characteristic cells of inflammatory processes in the connective tissue adjacent to the epithelium. It is important to note that in nondiabetic Nod animals there was also involution of the cytoplasmic and nuclear volume and the presence of eventual lipid droplets dispersed throughout the basal cytoplasm, as well as in the other layers forming the oral epithelium. However, the intensity of these structural alterations was nonsignificant compared to those observed in the diabetic Nod group, although the structures differed from the normal pattern observed in the control group. Few and divergent reports about the effects of diabetes on the structure of the oral mucosa are available in the literature. Elgeneidy et al. (1974), using homozygous obese mice that expressed diabetes, detected a chronic inflammatory process in connective tissue. Another study on the effects of chemically induced diabetes in rats detected a reduced cell proliferation rate 3 to 4 weeks after the characterization of diabetic status, with no epithelium atrophy (Hamilton & Blackwood, 1977). Reuterving et al. (1986), verified periodontal disease characterized by an inflammatory process in the oral tissue of rats with chemically induced diabetes. Similar studies on rats with diabetes of 2 weeks duration showed the presence of inflammatory cells adjacent to the oral epithelium with an inflammatory infiltrate in connective tissue characterized by a reduced occurrence of fibroblasts and collagen and an increase in

plasmocytes compared to healthy animals (Györfi et al., 1996; Seppälä, 1997). An experiment conducted on rats with streptozotocin-induced diabetes of 5 weeks duration did not show an effective inflammatory process, although it did show a reduced cell proliferation process and a reduced thickness of the lining epithelium (Shirai et al., 1998). Another study on the effects of chemically induced diabetes in rats submitted to mechanical pressure of the oral mucosa did not detect any inflammatory cells or epithelial atrophy, but did detect a reduced cell proliferation rate (Mori et al., 1999). Similar data were obtained also in experimentally diabetic rats over a period of 4 weeks, when cells of the oral mucosa were found to show accelerated DNA fragmentation and apoptosis in the presence of mechanical pressure with reduced intercellular adhesion in the spinosum layer and early exfoliation of the corneum layer. However, the authors emphasized the maintenance of laminar arrangement and cell layer thickness (Maruo et al., 2001). Thus, it was concluded that experimental diabetes led to significant cellular transformations in the different layers of the oral epithelium. In addition, it can be suggested that the time of maintenance of diabetic status wasn't decisive for the occurrence of inflammatory processes. Also, it was concluded that the morphological alterations detected in nondiabetic Nod animals, although discrete, predisposed to a deficient cell proliferation, adhesion and replacement process possibly causing functional deficiencies of the oral mucosa. In parallel to the experimental findings, previous clinical observations showed that diabetic patients are susceptible to oral diseases probably because of their reduced defenses against infections related to the impaired process of lesion healing to the suppression of collagen synthesis and to excessive collagenolytic activity leading to the destruction of periodontal tissues (Prichard, 1966; Grossi et al., 1996). Another study in which biopsies from 28 adult diabetic patients were assessed also revealed increased periodontal disease as demonstrated by the presence of chronic inflammatory cells (Hove & Stallard, 1970). In contrast, a study analyzing biopsies from diabetic patients of different ages did not demonstrate significant inflammatory processes in connective tissue or morphological changes in blood vessels (Listgarten et al., 1974). A similar study on diabetic patients of different ages revealed a high incidence of gingivitis and periodontitis with the intensity of these diseases being directly proportional to chronological age and not to the duration of diabetes (Cohen et al., 1970; Cianciola et al.,

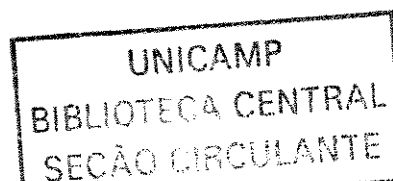
1982). However, Barnett et al. (1984) detected a low incidence of periodontitis in 45 young diabetic patients and suggested that it is not appropriate to relate the chronological age factor to the incidence of oral diseases. According to Renner (1981), diabetic patients wearing dentures present high rates of ulceration of the supporting oral mucosa. Thus, the tissue alterations detected in the present study definitely confirm the findings and inferences reported in the specialized clinical literature. It can be concluded that the structural and ultrastructural alterations characterized in the presence of diabetes mellitus impair the lining and protective functions and the transmission of sensations from the exterior environment to the oral mucosa, modifying the oral homeostasis and the clinical course of the processes of epithelial inflammation, regeneration and healing. In addition, these alterations expose the oral mucosa to the action of infectious agents and of possible carcinogens, topics that should be studied in future investigations.

V- BIBLIOGRAPHY

- Barnett, M.L.; Baker, R.L.; Yancey, J.M.; Macmilan, D.R. and Kotoyan, M. 1984. Absence of periodontitis in a population of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. *J. Periodontology*, 55, 402-405.
- Cagnon, V.H.A.; Camargo, A.M.; Rosa, R.M.; Fabiani, R.; Padovani, C.R. and Martinez, F.E. 2000. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). *Tissue & Cell*, 32, 275-283.
- Cianciola, L.J.; Park, B.H.; Bruck, E.; Mosovich, L. and Genco, R.J. 1982. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J. Am. Dent. Assoc.*, 104, 653-660.
- Cohen, D.W.; Friedman, L.A.; Shapiro, J.; Kyle, G.C. and Franklin, S. 1970. Diabetes mellitus and periodontal disease: Two-year longitudinal observations part I. *J. Periodontology*, 41, 709-718.
- Conget, I. 2002. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev.Esp.Cardiol.*, 55, 528-538.
- Cotran, R.S. 2000. *Patologia Estrutural e Funcional*. Guanabara Koogan, pp. 817-833.
- Daubresse, J.C.; Meunier, J.; Wilmotte, A.S.; Luickx, A.S. and Lefebvre, P.J. 1978. Pituitary-testicular axis in diabetic men with and without impotence sexual. *Diabete & Metabolisme*, Belgique, 4, 233-237.
- Elgeneidy, K.; Stallard, R.E.; Fillios, L.C. and Goldman, H.M. 1974. Periodontal and vascular alterations: Their relationship to the changes in tissue glucose and glycogen in diabetic mice. *J. Periodontology*, 45, 394-401.
- Ellemberg; Rifkin, 1962. Appud Carson, K. A. 1979. *Citochemical and Cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in the hereditary mouse model for diabetes mellitus*. A dissertation submitted to the faculty of the University of North Carolina at Chapel Hill. Doctor of Philosophy. Chapel Hill, N. C. USA.
- Fushini, H. 1980. The effect of parabiosis on serum and kidney glycosidase activities in spontaneously diabetic mice. *Diabetologia*, 19, 50-53.

- Gomes, I.; Cagnon, V.H.A.; Carvalho, C.A.F and De Luca, I.M.S. 2002. Stereology and ultrastructure of the seminal vesicle of C57/BL/6J mice following chronic alcohol ingestion. *Tissue & Cell*, 34, 177-186.
- Gomori, G.; Goldner, M.G. 1943. Production of diabetes mellitus in rats with alloxan. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54, 287-290.
- Grossi, S.G. et al. 1996. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J. Periodontol.*, 71, 1094-1102.
- Györfi, A.; Fazekas, Á, Fehér, E.; Ender, F. and Rosivall, L. 1996. Effects of streptozotocin-induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *J. Periodont. Res*, 31, 249-255.
- Hamilton, A.I.; Blackwood, H.J.J. 1977. Insulin deficiency and cell proliferation in oral mucosal epithelium of the rat. *J.Anat.*, 124, 757-763.
- Herberg, L.; Coleman, D. 1977. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism*, 26, 59-99.
- Ho, S.M. 1990. Prostatic androgen receptor and plasma testosterone level in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal Steroid Biochemical Molecular Biological*, 38, 67-72.
- Homo-delarche, F. 2001. Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes ?. *Braz Journal of Med and Biol Res.*, 34, 437-447.
- Hove, K.; Stallard, R.E. 1970. Diabetes and the periodontal patient. *Journal of Periodontology*, 41, 713-718.
- Hunt, E.L.; Bailey, D.W. 1961. The effects of alloxan diabetes on the reproductive system of young male rats. *Acta Endocrinologica*, Georgia, 38, 432-440.
- Karnovsky, J.M. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell. Biology*, 27, 137a-138a.
- Listgarten, M.A.; Ricker, F.H.; Laster, L.; Shapiro, J. and Cohen, D.W. 1974. Vascular basement lamina thickness in the normal and inflamed gingiva of diabetics and non-diabetics. *J. Periodontology*, 45, 676-684.
- Makino, S.; Kunimoto, K.; Muraoka, Y.; Mizushima, Y.; Katagiri, K. and Tochino, Y. 1980. Breeding of Non-Obese. *Diabetic strain of mice*, 1, 1-13.

- Maruo, Y.; Sugimoto, T.; Oka, M.; Hara, T. and Sato, T. 2001. Accelerated DNA fragmentation of the denture-bearing epithelium in an animal model of diabetes. *J. Oral Rehabil.* 28, 393-399.
- Ministério da saúde/ Diabetes Mellitus, *Internet Articles*. in: < <http://www.diabetes.med.com.br/artigos> > Access 2002 in 22/11.
- Montgomery, D.C. 1991. *Design and analysis of experiments*, 3 ed., New York: John Wiley, 649 p.
- Mori, S.; Sato, T.; Hara, H.; Shirai, Y.; Maruo, Y. and Minagi, S. 1999. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the denture-supporting tissues under continuous mechanical pressure in rat. *J. of Oral Rehabilitation*, 26, 80-90.
- Norman, G.R.; Streiner, D.L. 1994. *Biostatistics- The base essentials*, Mosby, St. Louis, p. 260.
- Parker, S.L. 1997. Cancer statistic. *Ca Cancer J. Clin.*, 47, 5.
- Prichard, J.F. 1966. Advanced periodontal disease: surgical and prosthetic management. 1 ed., Philadelphia: Saunders.
- Renner, R.P. 1981. Complete Dentures: A guide for patient treatment. 1 ed., New York: Masson Publishing USA.
- Reuterving, C.O. et al. 1986. Root surface caries and periodontal disease in long-term alloxan diabetic rats. *J. Dental Res.*, 65, 689-694.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 71, 208-212.
- Ritz, E. 2002. Consequences of late referral in diabetic renal disease. *Acta Diabetol*, 39, 3-8.
- Robbins, S.L. 1989. Doenças Sistêmicas. In: *Diabetes Mellitus. Patologia Estrutural e Funcional*. Canada: W.B. Saunders Company, pp. 238-250.
- Seppälä, B. 1997. Morphometric analysis of cellular and vascular changes in gingival connective tissue in long-term insulin-dependent diabetes. *J. Periodontol.*, 68, 1237-1245.
- Shirai, H.; Sato, T.; Hara, T. and Minagi, S. 1998. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the tissues under denture base and without mechanical pressure. *J. Oral Rehabilitation*, 25, 715-720.



- Stefan, S.F. 1996. Definition and classification of Diabetes including maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Mellitus, A fundamental and clinical text*, 251-259.
- Watson, M.L. 1958. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 727-730.
- Weibel, E.R. 1979. Steriological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Ver. Cytol.*, 26, 235-302.

Figure legends

Figure 1 Photomicrographs of the oral epithelium of mice. **A:** Control: keratinized, stratified squamous epithelium showing desquamation (arrow), wide epithelial cristae (curved arrow), muscle cells (arrowhead) and lamina propria (L). Note the four epithelial layers, i.e., basal (SB), spinosum (SS), granulosum (SG) and corneum (SC) cell layers. 750X, H.E. **B:** Nondiabetic Nod mice: keratinized, stratified squamous epithelium showing discrete desquamation (arrow), involution of epithelial cristae (curved arrow), lamina propria (L) and muscle cells (arrowhead). Note the reduced epithelium with differentiation of the basal (SB), spinosum (SS), granulosum (SG) and corneum (SC) cell layers. 750X, HE. **C:** Diabetic Nod mice: atypical keratinized, stratified squamous epithelium without evidence of epithelial desquamation (arrow), involution of epithelial cristae (curved arrow), marked involution of basal cells (SB), muscle cells (arrowhead) and lamina propria (L). 750X, HE.

Figure 2 Transmission electron photomicrographs of the epithelial cells of the oral mucosa of control animals. **A:** Observe the columnar basal cells (asterisk) and tonofilaments (T). 4.176X. **B:** Note the presence of the intact basement membrane (thin arrow), clearly visible nucleolus (NU) and condensed chromatin close to the nuclear membrane (C). 5.395X. **Inset:** Detail of the basal cell layer showing marked rough endoplasmic reticulum (arrowhead), mitochondria (M) and desmosome (D). 15.500X. **C:** Detail of the basal cell layer showing columnar cells and condensed chromatin close to the nuclear membrane (C). Lamina propria with collagen fibers (F). 11.625X. **D:** Spinosum cell layer containing polyhedral cells with a clearly visible nucleus (star), rough endoplasmic reticulum (arrowhead), mitochondria (M), electron-dense granules (E), tonofilaments (T), discrete intercellular space (long arrow) and clearly visible desmosomes (D). 5.395X. **E:** Flattened granulosum cells (asterisk) with a nucleus following the shape of the cell (star) and a clearly visible nucleolus (NU), mitochondria (M), electron-dense granules (E) associated with tonofilaments (T) and reduced intercellular space (long arrow). 5395X. **F:** Desquamation of the corneum layer (SC). 11.625X.

Figure 3 Transmission electron photomicrographs of the epithelial cells of the oral mucosa of nondiabetic Nod mice. **A:** Observe the involuted basal cells (asterisk), tonofilaments (T), lipid droplet (short arrow) and lamina propria with clearly visible collagen fibers (F). 5.395X. **B:** Intact basement membrane (thin arrow), mitochondria (M), marked rough endoplasmic reticulum (arrowhead) and tonofilaments (T). Note the condensed chromatin close to the nuclear membrane (C). 11.625X. **Inset:** Detail of the basal cell layer showing desmosomes (D). 15.500X. **C:** Detail of the basal cell layer showing nuclear deformity, marked rough endoplasmic reticulum (arrowhead), tonofilaments (T), a clearly visible nucleolus (NU), condensed chromatin close to the nuclear membrane (C), reduced intercellular space (long arrow) and the lamina propria with collagen fibers (F). 11.625X. **D:** Apparently involuted cells of the spinosum layer containing a clearly visible nucleus (star), mitochondria (M), electron-dense granules (E), tonofilaments (T), desmosomes (D), and condensed chromatin close to the nuclear membrane (C). Note the apparent increase in intercellular space (curved arrow). 5.395X. **E:** Apparently involuted granulosum cells with the nucleus following the shape of the cell (star), electron-dense granules (E) associated with tonofilaments (T), and reduced intercellular space (long arrow). 5.395X. **F:** Corneum cells showing discrete superficial desquamation (SC). 11.625X.

Figure 4 Transmission electron photomicrographs of epithelial cells of the oral mucosa of diabetic Nod mice. **A:** atypical and involuted basal cells (asterisk). Note the presence of lipid droplets in the epithelial layers (short arrow). 4.176X. **B:** Evident increase in the intercellular space (curved arrow). Note the presence of mitochondria (M), nucleus (star) and clearly visible nucleolus (NU). 5.395X. **Inset:** Detail of the basal cell layer, showing rough endoplasmic reticulum (arrowhead), golgi complex (G) and desmosomes (D). 15.500X. **C:** Detail of the basal cell layer showing involuted cells, increased intercellular space (curved arrow), lipid droplets (short arrow), mitochondria (M), nucleus with marked indentations (star), condensed chromatin close to the nuclear membrane (C) and a marked Golgi complex (G). 11.625X. **D:** Note the apparently involuted spinosum cells with lipid droplets (short arrow), irregular nucleus (star), condensed chromatin close to the nuclear membrane (C), mitochondria (M), electron-dense granules (E), apparently increased

intercellular space (curved arrow) and desmosomes (D). 11.625X. **E:** Apparently involuted granulosum cells (asterisk), nucleus following the shape of the cell (star), electron-dense granules (E) and reduced intercellular space (long arrow). 5.395X. **F:** Discrete desquamation of the corneum layer (SC). 11.625X.

Figure 1

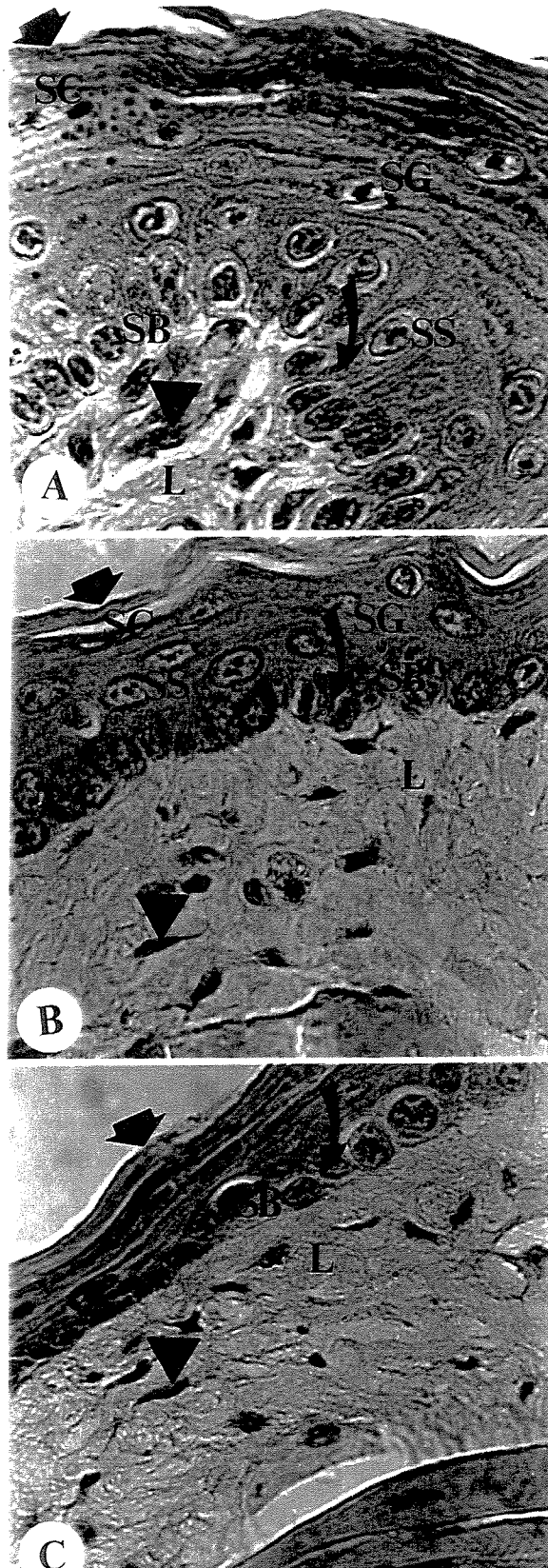


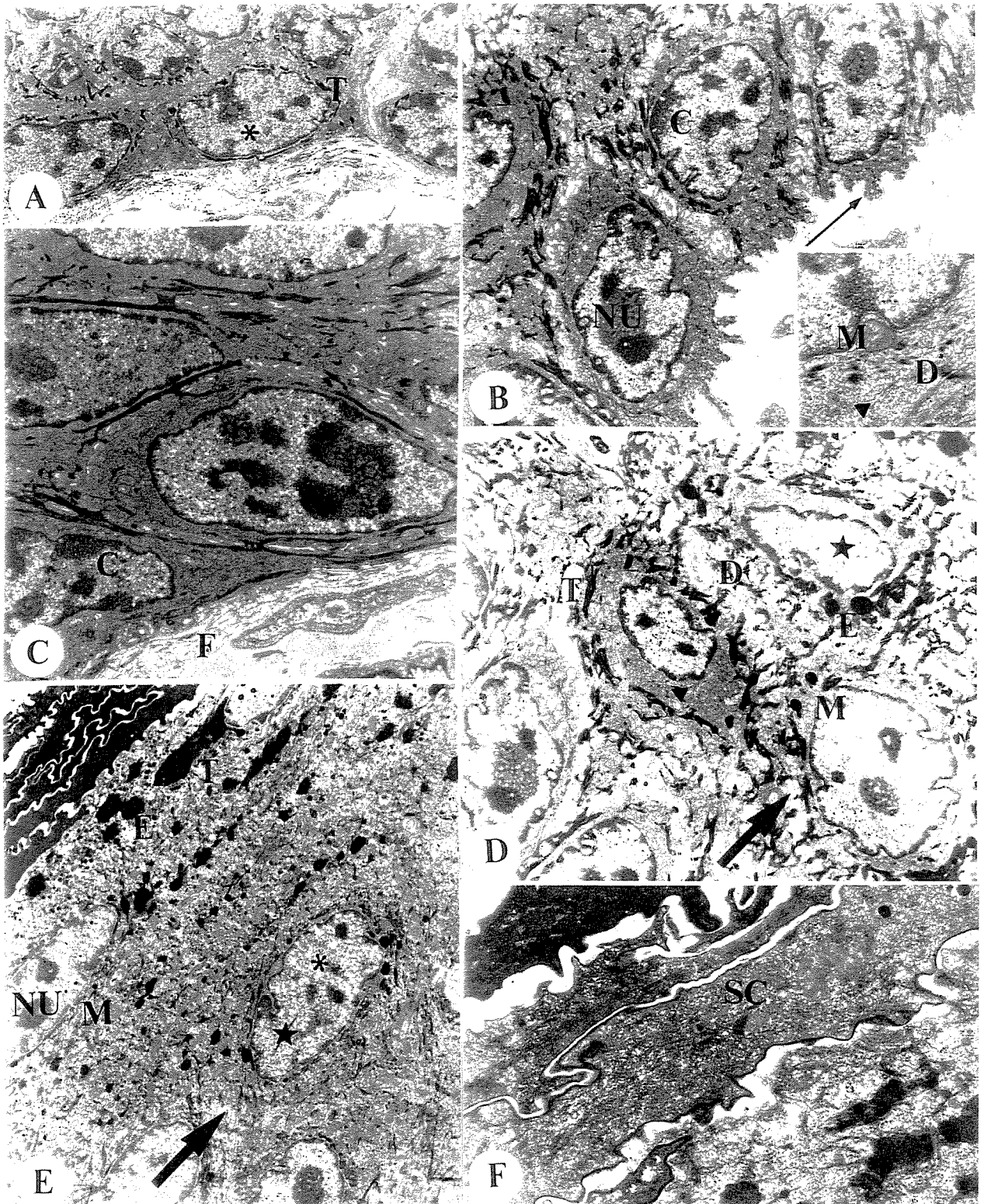
Figure 2

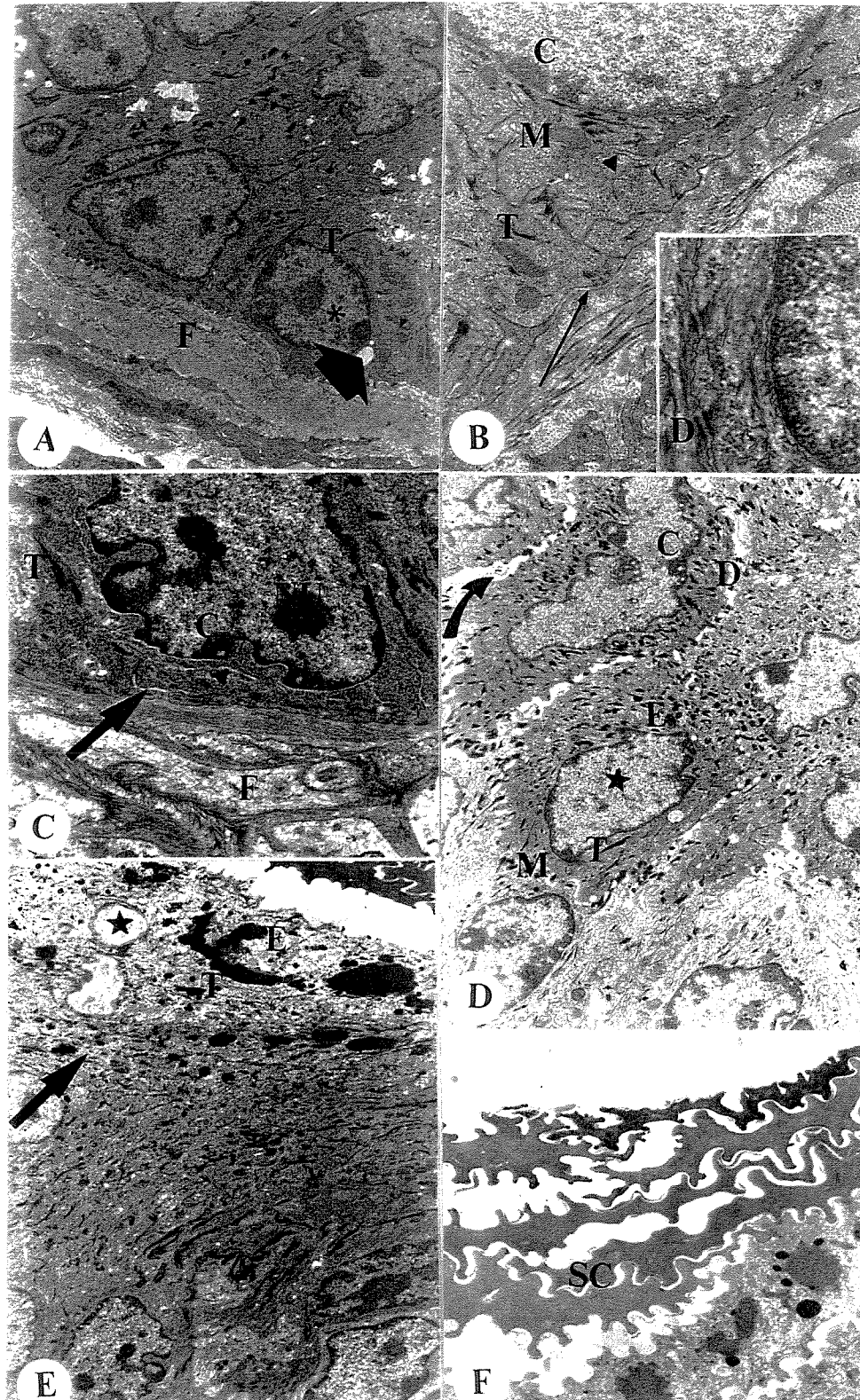
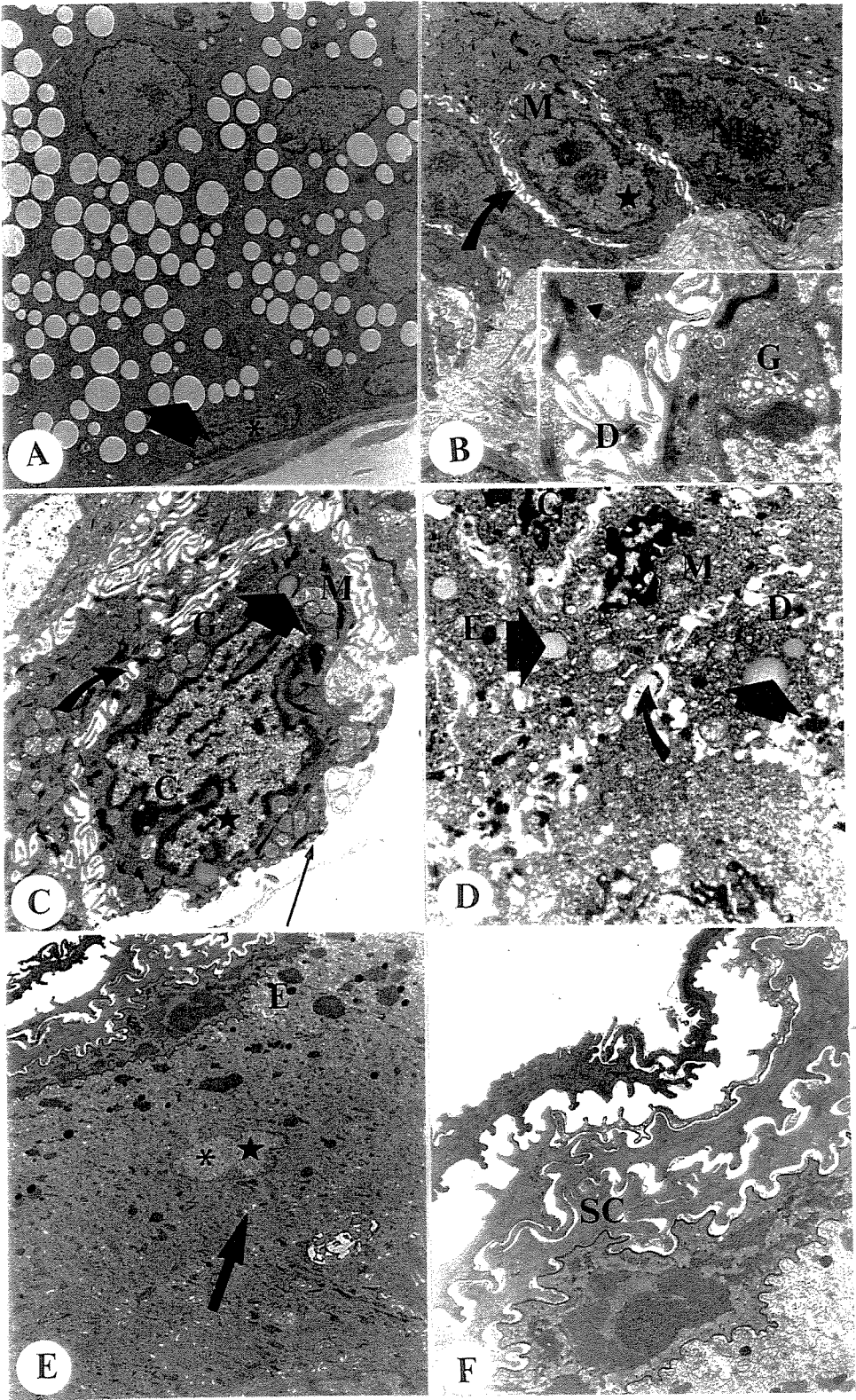
Figure 3

Figure 4



Tables

Table 1: Mean and standard deviation of body weight variation (final weight – initial weight), and fluid and solid ingestion in control and nondiabetic (Nod-) and diabetic (Nod+) Nod mice.

Variable	Control	Nod-	Nod+
Weight variation (g)	1.20±1.18	1.60±1.09	-2.40±1.15*
Fluid ingestion (ml)	47.94±4.11	24.72±2.99	173.86±11.74*
Solid ingestion (g)	37.65±4.20	47.84±5.50	55.25±2.99*

*Significantly different at the 1% level.

Table 2: Mean and standard deviation of nuclear and cytoplasmic volume of basal cells and thickness of the epithelium of the oral mucosa in control and nondiabetic (Nod-) and diabetic (Nod+) Nod mice.

Variable	Control	Nod-	Nod+
Nuclear volume (μm^3)	3.08±0.24(c)	2.34±0.29(b)	1.83±0.29(a)
Cytoplasmic volume (μm^3)	8.03±0.719(c)	6.30±0.78(b)	4.40±0.88(a)
Epithelial thickness (μm)	9.00±0.82(c)	4.30±0.48(b)	2.85±0.81(a)

*a,b,c indicate significant differences at the 1% level

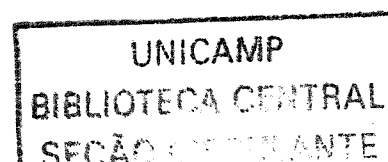
IV-CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES FINAIS

- 1) Nos camundongos comprovadamente diabéticos, observou-se perda de peso corpóreo mesmo tendo esses animais significativa ingestão de ração e de água, além de elevados níveis de proteína e glicose na urina, podendo-se concluir que o modelo experimental utilizado foi adequado caracterizando efetivo quadro diabético e drástico desequilíbrio metabólico, especialmente, de proteínas e de carboidratos.
- 2) O diabetes espontâneo provocou atrofia do epitélio bucal com nítido pleomorfismo das células da camada proliferativa, além de dificuldade na diferenciação dos diferentes estratos celulares. Na camada basal, detectou-se comprovada involução do volume citoplasmático, nuclear e acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma celular, assim como nas outras camadas que constituem o epitélio bucal. Contudo, não evidenciou-se a ocorrência de células características de processos inflamatórios. Assim, concluiu-se que o quadro de diabetes experimental levou a expressivas transformações celulares tanto da camada proliferativa como das camadas funcionais comprometendo os processos de reposição celular, revestimento e proteção, prejudicando a homeostase bucal. Também, pode-se sugerir a modificação do curso clínico nos mecanismos de reparo epitelial frente à processos infecciosos.
- 3) É importante destacar que, nos animais do grupo Nod sem a expressão do diabetes, também detectou-se involução do volume citoplasmático, nuclear e eventuais gotas lipídicas dispersas pelo citoplasma basal, assim como nas outras camadas que constituem o epitélio bucal. Porém, a intensidade de tais alterações estruturais foram insignificantes frente as ocorridas no grupo Nod positivo, mas diferenciais do padrão de normalidade representados no grupo controle. Podendo-se concluir que, as mudanças morfológicas demonstradas nos animais Nod negativos predispostos geneticamente ao diabetes, embora discretas podem levar à deficiência no desempenho das funções na mucosa bucal.

V-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L.C.; SULEIMAN, A.H.; GARRETT, J.R. Morphological effects of diabetes on the granular ducts and acini of the rat submandibular gland. *Microscopy Research and Technique*, England, v.27, p. 61-70, 1994.
- AVEDANO, G.F. Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. *Diabetes*, Alexandria, v.48, n. 7, p. 1443-1447, 1999.
- BARNETT, M.L.; BAKER, R.L.; YANCEY, J.M.; MACMILAN, D.R.; KOTOYAN, M. Absence of periodontitis in a population of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. *J. Periodontology*, v.55, p. 402-405, 1984.
- BYRNE, M.M. “*Insulin secretion in humans: Physiologic regulation and alteration in disease states*. Chapter I, Diabetes Mellitus. 1996. 3-11 p.
- CIANCIOLA, L.J.; PARK, B.H.; BRUCK, E.; MOSOVICH, L.; GENCO, R.J. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J. Am. Dent. Assoc.*, may, v.104, p. 653-660, 1982.
- CONGET, I. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev.Esp.Cardiol*, v.55, p.528-538, 2002.
- CREUTZFELDT, W. *The genetics of the diabetes mellitus*. New York Springer: Verlag, 1976.
- ELLEMBERG; RIFKIN, 1962. Appud CARSON, K. A. *Cytochemical and Cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in the hereditary mouse model for diabetes mellitus*. A dissertation submitted to the faculty of the University of North Carolina at Chapel Hill. Doctor of Philosophy. Chapel Hill, N. C. USA. 1979.
- ELGENEIDY, K.; STALLARD, R.E.; FILLIOS, L.C.; GOLDMAN, H.M. Periodontal and vascular alterations: Their relationship to the changes in tissue glucose and glycogen in diabetic mice. *J. Periodontology*, v.45, p. 394-401, 1974.
- FUSHINI, H. The effect of parabiosis on serum and kidney glycosidase activities in spontaneously diabetic mice. *Diabetologia*, v.19, p.50-53, 1980.

- FRANTZIS, T.G. The ultrastructure of capillary basement membranes in the attached gingiva of diabetic and nondiabetic patients with periodontal disease. *J. Periodontology*, v.42, p. 406-411, 1971.
- GOMORI, G.; GOLDNER, M.G. Production of diabetes mellitus in rats with alloxan. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.54, p. 287-290, 1943.
- GUGGENHEIMER, J.; MOORE, P.A.; ROSSIE, K.; MYERS, D.; MONGELLUZZO, M.B.; BLOCK, H.M.; WEYANT, R.; ORCHARD, T. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies. I. Prevalence and characteristics of non-candidal lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, may, v. 89, n. 5, p. 563-569, 2000.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Medica*. Philadelphia, 1996. 892-894 p.
- GYÖRFI, A.; FAZEKAS, Á; FEHÉR, E.; ENDER, F.; ROSIVALL, L. Effects of streptozotocin-induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *J. Periodont. Res.*, v.31, p. 249-255, 1996.
- HAMILTON, A.I.; BLACKWOOD, H.J.J. Insulin deficiency and cell proliferation in oral mucosal epithelium of the rat. *J.Anat.*, v. 124, p. 757-763, 1977.
- HERBERG, L.; COLEMAN, D. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism*, v.26, p.59-99, 1977.
- HO, S.M. Prostatic androgen receptor and plasma testosterone level in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal Steroid Biochemical Molecular Biological*, mar., v. 38, n. 1, p. 67-72, 1990.
- HOVE, K.; STALLARD, R.E. Diabetes and the periodontal patient. *Journal of Periodontology*, v.41, p. 713-718, 1970.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.O tubo digestivo. In: *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. cap. 15. 241-243 p.
- KARNOVSKY, J.M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell. Biology*, v. 27, p. 137a-138A, 1965.
- KAVIKUMAR, P.; ANURADHA, C.V. Effects of fenugreek seeds on blood lipid peroxidation and antioxidants in diabetic rats. *Phytotherapy Research*, may., v. 13, n. 3, p. 197-201, 1999.



- KOVAKS, J.; ZILAHY, M.; BANYASZ, T.; GOMBA, S. Evaluation of apoptosis and cell proliferation in experimentally induced renal cysts. *Urological Research*, dec., v. 26, n. 6, p. 411-416, 1998.
- LEE, Y.J.; PARK, Y.M.; CHOI, E.M. Oxidative DNA in rats with diabetes induced by alloxan and streptozotocin. *Journal of Biochemistry and Molecular*, 1999.
- LISTGARTEN, M.A.; RICKER, F.H.; LASTER, L.; SHAPIRO, J.; COHEN, D.W. Vascular basement lamina thickness in the normal and inflamed gingiva of diabetics and non-diabetics. *J. Periodontology*, v. 45, p. 676-684, 1974.
- MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y. Breeding of Non-Obese. *Diabetic strain of mice*, v. 1, p. 1-13, 1980.
- MANDARIM DE LACERDA, C. A. *Métodos quantitativos em morfologia*. EDUERJ, Rio de Janeiro. 1995.
- MARCONDES, C.A. O reparo tecidual da mucosa bucal de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental. Campinas: Instituto de Biologia, Unicamp, 2002. 112f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural/Anatomia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E.; WATANABE, I. Morphological changes on the hard palatine mucosa of rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) after chronic alcohol consumption. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 30, n. 3, p. 379-384, 1998.
- MARUO, Y.; SUGIMOTO, T.; OKA, M.; HARA, T.; SATO, T. Accelerated DNA fragmentation of the denture-bearing epithelium in an animal model of diabetes. *J. Oral Rehabil.*, v. 28, n. 4, p. 393-399, 2001.
- MCMILLAN, M.D. The surface structure of the completely and incompletely orthokeratinized oral epithelium in the rat: A light, scanning and transmission electron microscope study. *Am. J. Anat.*, v. 156, p. 337-352, 1979.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. *GUIA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA*. Brasília, Cap.5.5.1998.
- MONTGOMERY, D.C. *Design and analysis of experiments*, 3 ed., New York: John Wiley, 1991. 649 p.

- MORI, S.; SATO, T.; HARA, H; SHIRAI, Y.; MARUO, Y.; MINAGI, S. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the denture-supporting tissues under continuous mechanical pressure in rat. *J. of Oral Rehabilitation*, v. 26, p. 80-90, 1999.
- MJÖR, I.A; FEJERSKOV, O. *Embriologia e histologia oral humana.*; Tradução Lidia Sabbag Utrilla, Lizete Toledo de Oliveira Ramalho, Renato de Toledo Leonardo, São Paulo: Panamericana, 1990. 333 p.
- NATTRAS, M.; HALLES, P.F. Clinical Endocrinology and Diabetes. In: *Diabetes Mellitus*, New York: Churchill Livingstone, 1988. 155-182 p.
- NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. *Biostatistics- The base essentials*, Mosby, St. Louis, 1994. 260 p.
- ORIE, N.N.; ANAYAEGBU, N.O. Nifedipine effectively lowers salt-induced high blood pressure in diabetic rats. *General Pharmacology*, apr., v. 32, n. 4, p. 471-474, 1999.
- PALOMAR-MORALES, M. Fetal development in alloxan-treated rats. *Reproductive Toxicology*, dec., v. 12, n. 6, p. 659-665, 1998.
- PARKER, S.L. Cancer statistic. *Ca Cancer J. Clin.*, v. 47, p. 5, 1997.
- PEREZ, R.M. et al. Effect of triterpenoids of *Bouvardia terniflora* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine*, dec., v. 5, n. 6, p. 475-478, 1998.
- RAMAMURTHY, N.S.; GOLUB, L.M. Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin. *Journal of Periodontal Research*, v. 18, p. 23-30, 1983.
- REUTERVING, C.O.; HÄGG, E.; GUSTAFSON, G.T. Root surface caries and periodontal disease in long-term alloxan diabetic rats. *J. Dental Res.*, v. 65, p. 689-694, 1986.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v. 71, p. 208-212, 1963.
- RITZ, E. Consequences of late referral in diabetic renal disease. *Acta Diabetol*, v. 39, p. 3-8, 2002.
- ROBBINS, S.L. Doenças Sistêmicas. In: *Diabetes Mellitus. Patologia Estrutural e Funcional*. Canada: W.B. Saunders Company, 1989. 238-250 p.
- SAPRYKINA, E.V. et al. The study of phospholipids in liver of mice with alloxan diabetes. *Voprosy Meditsinskoi Khimii, Moscow*, aug., v. 44, n. 4, p. 376-379, 1998.

- SEETHALAKSHMI, L.; MENON, M.; DIAMOND, D. The effects of streptozotocin induced diabetes on the neuro endocrine male reproductive tract axis of the adult rat. *J. Urology*, v. 138, p. 190, 1987.
- SHIRAI, H.; SATO, T.; HARA, T.; MINAGI, S. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the tissues under denture base and without mechanical pressure. *J. Oral Rehabilitation*, v. 25, p. 715-720, 1998.
- STEFAN, S.F. Definition and classification of Diabetes including maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Mellitus, A fundamental and clinical text*, 1996. cap. 27. 251-259 p.
- WATSON, M.L. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v. 4, p. 727-730, 1958.
- WEIBEL, E.R. 1979. Steriological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Ver. Cytol.*, 26, 235-302.
- YLDIRIM, S. et al. The effects of long-term oral administration of l-arginine on the erectile response of rabbits with alloxan-induced diabetes. *BJU International*, Oxford, apr., v. 83, n. 6, p. 679-675, 1999.
- ZORZETO, D. L. G. Estudo ultra-estrutural da mucosa oral da bochecha de ratos, *rattus norvegicus*, submetidos ao alcoolismo crônico experimental. Botucatu: Instituto de Biociências, Unesp, 1997. 73f. Dissertação (Mestrado em Morfologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, 1997.