



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AVALIAÇÃO ELEMENTAL DO LIGAMENTO PERIODONTAL NA DIABETES EXPERIMENTAL

VANESSA HENRIQUES GONÇALVES

ORIENTADOR: MESTRE ENG. JOSÉ RICARDO CABEÇAS

CO-ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO SILVÉRIO CABRITA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Coimbra, Junho de 2015

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Mestre Eng. Ricardo Cabeças agradeço a orientação, os conselhos e todo o apoio no tratamento dos dados.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor António Silvério Cabrita pela sabedoria e pelos conhecimentos transmitidos que foram essenciais na realização deste trabalho.

Ao departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, por ceder o equipamento necessário para a elaboração deste trabalho e um especial agradecimento ao Dr. Alexandre Trindade por toda a disponibilidade.

Ao Mestre Dr. Eduardo Costa pelo apoio laboratorial e ao Dr. Miguel Marto pela disponibilidade e ajuda demonstrada.

A todos os meus colegas de curso, que tornaram esta caminhada menos difícil, obrigada.

Não posso deixar de agradecer às minhas amigas Ana Teresa, Gwen, Teresa Carrilho, Claudinha, Rosana Garcia, Patrícia Ribeiro, Cláudia Escoli, Bárbara Costeira e Joana Cruz, pela vossa amizade e por estarem sempre presentes quando mais precisei de vocês.

À minha melhor amiga, Sara, por tudo o que representa para mim, pelo que vivemos e pelo que ainda está para vir... obrigada.

Ao João... por Tudo, a minha enorme gratidão.

Aos meus pais e ao meu irmão, os meus grandes heróis. Pela força e pelo apoio incondicional. Sem vocês nada disto seria possível, o meu mais profundo obrigado.

Índice

Introdução	1
Objetivos	10
Materiais e Métodos	11
Resultados	14
Discussão	19
Conclusões	21
Bibliografia	22

Lista de Figuras

- 1 Equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor. 12
- 2 ilustração do local de incidência do feixe de raio-X. Fonte: imagem fotografada pelo autor. 13
- 3 Software do equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor. 13

Lista de Tabelas

I	Média e desvio padrão dos valores obtidos nos grupos controle e teste, com a respectiva significância estatística (valor de p).	15
II	Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo controle.	17
III	Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo teste.	17
IV	Valores de p obtidos a partir dos coeficientes dos vários elementos com o potássio, fósforo e enxofre, entre o grupo controle e teste.	18

Resumo

Introdução: A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica de etiologia múltipla que se caracteriza por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo dos açúcares, dos lípidos e das proteínas. Existe uma forte evidência sugerindo que doentes com diabetes *mellitus* têm maior predisposição para desenvolver doença periodontal, especialmente em diabéticos com um controlo metabólico reduzido. Uma vez que o ligamento periodontal é uma estrutura que faz parte do periodonto de inserção, quando afetado, este pode comprometer a função do dente na cavidade oral.

Objetivo: Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da diabetes experimental no ligamento periodontal de ratos *Wistar* ao nível atômico. Esta avaliação foi feita através da técnica de fluorescência de raio-X.

Materiais e Métodos: Utilizaram-se 14 ratos *Wistar* machos com 8 semanas de idade no início do estudo. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=7 em cada grupo). O período experimental decorreu durante 4 semanas para os dois grupos. O grupo I constituiu o grupo controlo e foi mantido sem manipulação indutora de alterações e o grupo II constituiu o grupo teste ao qual foi induzida diabetes experimental. Após sacrifício foi feita a recolha da mandíbula para estudo do ligamento periodontal. As amostras foram analisadas pela técnica de fluorescência de raios-X, onde foi incidido um feixe de raio-X com uma energia de 15 keV e com um tempo de exposição de 200s. Estes dados foram submetidos a análise estatística através do teste t-Student para um nível de confiança de 95%.

Resultados: Através da técnica de fluorescência de raio-X foram identificados os seguintes elementos: cálcio, fósforo, potássio, cloro, enxofre, ferro e o alumínio. Os valores médios das contagens por segundo para os vários elementos encontrados, tanto no grupo teste, como no grupo controlo, não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Relativamente ao rácio dos elementos com o potássio, fósforo e enxofre, apenas o rácio potássio/fósforo apresentou um valor estatisticamente significativo.

Conclusão: De acordo com estudo efectuado concluímos que é necessário uma repetição do estudo com uma amostra maior. Contudo parece-nos razoável aceitar desde já que as alterações patológicas se possam iniciar com alterações das relações entre os elementos existentes na estrutura.

Palavras-chave: Diabetes, Diabetes Experimental, Ligamento periodontal, Caracterização Elemental, Fluorescência de Raio-X

Abstract

Introduction: Diabetes *mellitus* is a metabolic disorder characterized by defects in insulin secretion, action, or both, leading to chronic hyperglycaemia and disturbances in the metabolism of carbohydrates, fat and proteins, like those from collagen connective tissue. There is strong evidence suggesting that patients diagnosed with diabetes *mellitus* have more predisposition to developed periodontal diseased, specially diabetics with poor metabolic control. Since the periodontal ligament is a structure, that is part of the periodontium, when it is affected, it can compromise the oral function of the tooth.

Objective: This study aims to evaluate the effect of experimental diabetes on the periodontal ligament of *Wistar* rats. The evaluation was made through the elemental characterization by X-ray fluorescence technique.

Materials and Methods: Used a sample of 14 male *Wistar* rats ate the age of 8 weeks at study start. The animals were randomly divided into two groups (n = 7 in each group). The experimental period lasted for 4 weeks for both groups. Group I was the control group and was maintained without manipulation inducing changes and group II constituted the test group, which was induced experimental diabetes. After the sacrificed was done the collection of jaws to analyze the periodontal ligament. The samples were analyzed by X-ray fluorescence technique in which the X-ray beam had energy of 15 KeV and an exposition time of 200s. This data was submitted to statistical analysis, using student's t-test.

Results: Through the X-ray fluorescence technique was identified the following elements: calcium, phosphorus, potassium, chloride, sulfur, iron and aluminum. The mean values of the counts per second for each element found, both in the test and control group, were not statistically significant. In relation to the ratio of the elements with potassium, phosphorus and sulfur, only the ratio potassium/phosphorus showed a statistically significant value.

Conclusion: According to study conducted we concluded that a repeat study is needed with a larger sample. However it seems reasonable to accept the outset that the pathological changes can be initiated to change the relationship between the existing elements in the

structure.

Keywords: Diabetes, Experimental Diabetes, Periodontal Ligament, X-ray Fluorescence

Introdução

A origem do universo foi sempre uma preocupação central da humanidade. Os nossos antepassados explicavam esta origem com base em fundamentos religiosos, mitológicos ou filosóficos. Para estas civilizações, o entendimento do universo era algo muito distinto do que aquilo que nos é ensinado hoje pela ciência¹.

Atualmente, o modelo que reúne maior consenso junto da comunidade científica relativamente ao instante da formação do Universo, é a Teoria do *Big Bang*. Segundo esta, houve um momento - há 15 mil milhões de anos - em que a matéria conhecida estaria concentrada num ponto único de densidade incomensurável cuja explosão assinalaria o começo do universo. O universo era inicialmente muito quente e denso. Contudo, este foi arrefecendo e expandindo-se, e enquanto isto acontecia, a matéria foi-se organizando em estruturas cada vez mais completas. A evolução do universo surgiu na sequência de reações nucleares entre as partículas fundamentais do meio cósmico, cujo efeito mais importante e determinante se prendeu pela formação dos elementos químicos²³⁴⁵.

Todos os átomos são produzidos nas estrelas, em etapas bem definidas. No entanto, alguns segundos após o Big Bang (10^{32} K) muito antes de existirem estrelas, deu-se a chamada nucleossíntese primordial. Nesta fase, como a temperatura do universo era ainda muito elevada (10^9 K), apenas se formaram alguns isótopos (deutério, trítio, hélio-3, hélio-4, lítio-7 e berílio-7) de elementos químicos com número atómico inferior a 5. A temperatura foi baixando, o que permitiu a formação do átomo de hidrogénio: o ponto de partida para a formação de estrelas². Numa fase inicial uma estrela é formada por agregação de pó interestrelar, maioritariamente formado por hidrogénio. Esta estrela entra em ignição e

forma-se uma estrela amarela. Nesta observa-se a fusão do hidrogénio e a formação de hélio. À medida que a estrela envelhece acumula-se hélio que começa a fundir para formar átomos mais pesados, como o carbono e o oxigénio. Quando a temperatura central atinge $2,2 \times 10^8$ K, observa-se a fusão do hélio com a formação de carbono, oxigénio, néon e magnésio. Nesta fase a estrela é uma vermelha gigante. Numa etapa posterior a temperatura sobe para 3×10^8 K, adquire a forma de supergigante vermelha e pela fusão do hélio com o carbono, entre átomos de carbono e entre carbono e oxigénio, observa-se a formação de sódio, silício, enxofre, árgon e cálcio. Numa fase seguinte a temperatura atinge 3×10^9 K e estamos na presença de uma estrela de grande massa supergigante vermelha, que sintetiza ferro e níquel, pela fusão de átomos previamente sintetizados. Pelo colapso e explosão de uma grande estrela forma-se uma supernova que apresenta uma temperatura de 1×10^{11} K e é capaz de sintetizar átomos de número atómico superior a 28².

Os elementos químicos são componentes básicos de todos os tecidos de um organismo vivo. Deste modo, a sua identificação é relevante uma vez que estes desempenham um papel importante no funcionamento de tecidos e órgãos⁶.

Está descrita a presença de diversos componentes inorgânicos no corpo humano, sendo que estes elementos químicos estão classificados de acordo com a sua concentração no organismo. Assim, os elementos principais são aqueles que aparecem em maior quantidade, cerca de 60% a 80% de todo o material inorgânico do organismo, sendo eles: o cálcio, o fósforo, o magnésio, o sódio, o potássio, o cloro, o enxofre e o lítio. Existem outros elementos que surgem em quantidades muito menores, os oligoelementos, no entanto, alguns deles são essenciais para muitos processos vitais. Estes classificam-se de acordo com as suas necessidades dietéticas como: essenciais (cobalto, cobre, crómio, flúor, ferro, manganês, molibdénio, selénio, zinco e iodo), provavelmente essenciais (estanho, níquel, silício e vanádio) e não essenciais (alumínio, antimónio, arsénio, bismuto, boro, cádmio, germânio, mercúrio, ouro, platina, chumbo, rubídio e titânio)⁷.

O cálcio (Ca) é o elemento mineral mais abundante no organismo. Uma grande percentagem deste elemento está presente nos ossos e nos dentes: ora sob a forma cristalina (hidroxiapatite), ora sob a forma amorfa (fosfato de cálcio). Uma percentagem mais pe-

quena de cálcio está presente nos fluidos corporais e nos tecidos moles. A principal função do cálcio no metabolismo humano é a de proporcionar a dureza característica aos ossos e aos dentes. No entanto, o cálcio também tem um papel vital em processos essenciais do organismo tais como: na coagulação sanguínea; na contração muscular; na secreção hormonal; na ativação enzimática; na adesividade celular; na transmissão do impulso nervoso; na manutenção da função das membranas celulares e como segundo mensageiro intracelular⁷.

O fósforo (P) é o segundo elemento mais abundante no organismo, encontrando-se sob a forma de fosfato. Mais de 80% do fósforo está combinado com o cálcio formando os ossos e os dentes e cerca de 10% está presente no músculo. Uma pequena concentração de fósforo está presente no plasma, sendo que 88% do fósforo plasmático forma complexos com cátions monovalentes e divalentes, tais como Na^+ , Ca^+ e Mg^{2+} . O fosfato é o principal anião do fluido intracelular, sendo que uma grande percentagem faz parte de fosfoproteínas, fosfolípidos e açúcares fosforilados e apenas uma pequena parte se encontra na sua forma livre. Já no fluido extracelular, grande parte do fosfato encontra-se na sua forma livre enquanto apenas 10% se encontra associado a proteínas. Está presente na estrutura de todas as membranas celulares tanto externas como internas. Intervém na estrutura dos ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico) e dos nucleótidos, tanto lineares (adenosina monofosfato, adenosina difosfato, adenosina trifosfato e guanosina trifosfato), como cíclicos (adenosina monofosfato cíclico e monofosfato cíclico de guanosina). As funções mais importantes do fosfato no organismo são a formação e manutenção dos ossos e dos dentes e a sua participação na transferência de energia metabólica. Também participa na regulação do equilíbrio corporal ácido-base. Tem propriedades de tampão, daí a sua importância na saliva e no sangue⁷.

O cloro (Cl) está presente em altas concentrações no líquido extracelular, onde se neutraliza com o sódio, enquanto que no interior das células se neutraliza com o potássio. O ião cloreto atua, juntamente com o sódio, na manutenção da pressão osmótica e do equilíbrio ácido-base. O ácido clorídrico que é libertado no estômago durante a digestão produz-se a partir do cloreto plasmático⁷.

O potássio (K) geralmente aparece na forma de íon K^+ . É o principal catião do líquido intracelular, onde, entre outras funções, serve de reservatório para manter constante a sua concentração no líquido extracelular. Regula o equilíbrio ácido-base e a pressão osmótica no interior da célula. Está relacionado com a atividade de diferentes enzimas, como a piruvato cinase, assim como com a síntese das proteínas nos ribossomas. A sua influência sobre a atividade do sistema nervoso depende da sua distribuição na membrana neuronal, dado que a sua saída para o exterior da célula contribui para a transmissão do impulso nervoso. Também está relacionado com a atividade da ATPase Na^+/K^+ dependente⁷.

O enxofre (S) pode encontrar-se fazendo parte de estruturas orgânicas: como nos aminoácidos metionina e cisteína; nas vitaminas como a tiamina, biotina e a coenzima A. Pode também fazer parte de estruturas inorgânicas como sulfato de sódio, sulfato de potássio ou sulfato de magnésio. Encontra-se em todas as células do organismo e no sangue. Participa em reações de sulfatação, que atuam como mecanismos de desintoxicação do organismo, ajudando a sua eliminação pela urina⁷.

Uma grande percentagem de ferro (70%) é denominado de funcional pois aparece associado a proteínas como a hemoglobina, mioglobina, e várias enzimas intracelulares, como os citocromos. Cerca de 85% do ferro (Fe) funcional encontra-se nos eritrócitos formando parte da hemoglobina. Os restantes 30% de ferro são denominados de não essenciais pois têm uma função de armazenamento. Este último grupo é formado principalmente por ferritina e hemossiderina. A função mais importante do ferro no organismo está associada às diversas proteínas das quais faz parte, por serem vitais para o funcionamento do organismo e que estão relacionadas com o transporte de oxigénio e com a sua oxidação. A maior parte das proteínas tem um grupo -hemo na sua estrutura. Assim, a hemoglobina é imprescindível para o transporte do oxigénio até aos tecidos, onde se realizará a respiração celular⁷.

O alumínio (Al) é o metal mais abundante da crosta terrestre e, paradoxalmente, não tem nenhuma função biológica conhecida (oligoelemento não essencial), sendo conhecido por ser tóxico para as plantas e animais, incluindo o ser humano⁷⁻⁹. A sua toxicidade pode causar alterações no desenvolvimento e reprodução. O alumínio é também conhecido

por ser neurotóxico e tem sido associado a algumas doenças tais como: esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. O alumínio ao entrar no cérebro pela barreira hemato-encefálica leva a morte neuronal através da indução de stress oxidativo, apoptose, mudanças na conformação do ADN e alterações na expressão genética⁸.

Relativamente ao órgão dentário - esmalte, dentina e cimento - existe uma vasta bibliografia que faz a caracterização elemental destas estruturas^{6 10-18}. Por outro lado, no que toca às estruturas de suporte, nomeadamente o ligamento periodontal (LP), esta é escassa, surgindo a necessidade de caracterizar esta estrutura.

O Ligamento Periodontal é um tecido que faz parte do periodonto de inserção: sistema responsável pela ancoragem dos dentes aos alvéolos dentários e que engloba outros tecidos como o cimento e o osso alveolar. Relativamente ao LP, este tecido circunda as raízes dos dentes, estando localizado entre dois tecidos mineralizados, o cimento radicular e o osso alveolar propriamente dito (lâmina dura)^{19,20}. O LP apresenta funções mecânicas, nutritivas, formativas e sensoriais. Histologicamente, o LP é um tecido conjuntivo fibroso, não mineralizado, altamente vascularizado e rico em células, fibras e substância fundamental. As células presentes no LP são maioritariamente fibroblastos, no entanto também estão presentes macrófagos, células mesenquimatosas indiferenciadas, osteoblastos, osteoclastos e cementoblastos.⁷ Por se tratar de um tecido conjuntivo apresenta na sua composição concentrações de oxigénio, carbono, hidrogénio, azoto, sódio, enxofre e cloro²¹.

Existem várias técnicas que permitem fazer a análise elemental de uma amostra. Neste estudo foi utilizada a técnica de Fluorescência de raio-X, cujo princípio é bastante simples. Os raio-X são emissões electromagnéticas com aplicações em várias áreas. A sua natureza é idêntica à da radiação visível, no entanto com um comprimento de onda bastante mais curto, situando-se entre 10^{-2} nm e os 10nm. Esta radiação quando incidida numa amostra permite a identificação de elementos químicos nela presentes.

Sabemos que, de acordo com o efeito fotoeléctrico, uma fonte de radiação X adequada tem capacidade de ionizar um dado elemento numa amostra. Por sua vez, esta ionização, fará com que electrões sejam arrancados, preferencialmente das camadas mais próximas

do núcleo, criando uma lacuna interna no seu lugar e deixando o átomo energeticamente instável. Deste modo, e para que o ião volte ao seu estado fundamental, esta lacuna vai ser preenchida por electrões da camada seguinte ou mesmo de camadas mais afastadas. Estas transições vão acontecendo até que a lacuna seja transferida para camadas mais externas levando o ião para um estado energeticamente mais baixo. Deste modo, todas as transições entre camadas vão corresponder a um fotão com uma determinada energia designada por raio-X característico de cada elemento²²⁻²⁶.

Para um elemento químico poder ser detectado por esta técnica tem de ter uma emissão de raio-X característico superior a 1 KeV, isto é, apenas elementos com número atómico superior a 11 são detectados, como é o caso do sódio²⁵.

Comparativamente com outras técnicas de análise elemental, a fluorescência de raio-X é uma técnica mais simples, rápida e económica. Relativamente à amostra, esta não precisa de um tratamento prévio nem é destruída durante a análise. Mais ainda, na mesma amostra podem ser identificados vários elementos, e estas podem ser sólidas, líquidas ou gasosas. Por outro lado, existem algumas desvantagens inerentes à técnica, como a complexidade na interpretação dos espectros de emissão e a dificuldade em fazer uma análise quantitativa dos elementos da amostra^{24,25}.

A radiação branca ou radiação de fundo é um espectro contínuo devido à interação do feixe de raio-X no próprio material do equipamento. Esta radiação está sobreposta ao espectro característico de cada elemento o que pode dificultar em alguns casos a análise do espectro²⁵.

Os ratos utilizados neste estudo foram induzidos com diabetes experimental.

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica de etiologia múltipla que se caracteriza por hiperglicemia crónica com distúrbios no metabolismo dos açúcares, dos lípidos e das proteínas. Esta doença é resultado, em alguns casos, de defeitos na produção de insulina, noutros na ação da insulina e, frequentemente, há combinação destes dois fatores²⁷. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a prevalência global da diabetes em 2014 foi de 9%²⁸. Em Portugal a prevalência da doença, em indivíduos com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, ronda os 13% ou seja, neste grupo etário, mais de 1 milhão

de portugueses têm diabetes. Verifica-se uma diferença estatisticamente significativa na prevalência da doença relativamente ao género sendo o sexo masculino o mais afetado. Consta-se também um grande aumento da prevalência da diabetes com a idade²⁹.

Consoante a etiologia, a diabetes *mellitus* pode ser classificada em diferentes formas, no entanto, a grande maioria dos diabéticos apresenta diabetes tipo 1 ou diabetes tipo 2. A diabetes tipo 1 afeta indivíduos de qualquer idade nomeadamente crianças ou adultos jovens, sendo a sua prevalência cerca de 5 a 10% dos casos. É caracterizada por uma destruição auto-imune das células beta do pâncreas levando a uma deficiência absoluta de insulina. Deste modo, os portadores desta doença necessitam diariamente de insulina exógena para controlar os níveis de glicose no sangue, evitando estados de hiperglicemia crónica²⁹⁻³¹.

A diabetes tipo 2, bastante mais frequente é responsável por 90 a 95% dos casos³⁰. É caracterizada por um desequilíbrio na secreção de insulina pois ocorre quando o pâncreas não consegue produzir insulina suficiente ou quando o organismo não consegue utilizar eficazmente a insulina produzida. Esta condição tem como principais fatores de risco a obesidade, o sedentarismo, o envelhecimento e a predisposição genética. Na grande maioria dos casos, estes doentes não precisam de insulina exógena para controlar a hiperglicemia. O tratamento passa por uma redução do peso, através de uma dieta equilibrada e prática de exercício físico, associada a antidiabéticos orais^{29,30}.

Quando um doente está descompensado, apresentando elevados níveis de glicose no sangue, apresenta sintomas típicos como: poliúria, polidipsia, perda de peso, e por vezes polifagia e visão turva. A hiperglicemia com cetoacidose é uma das consequências agudas e fatais da diabetes não controlada³⁰. A longo prazo, os efeitos da hiperglicemia crónica podem traduzir-se na disfunção e falência de diferentes órgãos e/ou sistemas, sendo eles: os olhos (retinopatia), os rins (nefropatia), o coração (doença coronária), os nervos periféricos (neuropatia periférica) e o sistema vascular (acidente vascular cerebral)^{30,32}. Alterações no metabolismo das lipoproteínas, hipertensão arterial e doença periodontal são também condições frequentemente encontradas em diabéticos³².

Considerando a prevalência da diabetes *mellitus*, é de grande importância que os clíni-

cos consigam identificar ou antecipar algumas manifestações orais típicas da doença e que conheçam as suas particularidades sistémicas que podem condicionar o tratamento dentário. Algumas manifestações orais são por vezes encontradas em doentes diabéticos, tais como: disfunção salivar, levando a xerostomia e cáries dentárias; alterações da mucosa como líquen plano e estomatites aftosas recorrentes; infecções fúngicas como candidíase oral; distúrbios neurosensoriais como glossodínia e disestesias; alterações do paladar e dificuldades na cicatrização³³⁻³⁵.

Existe ainda uma forte evidência sugerindo que a diabetes *mellitus* está associada a um aumento do risco de desenvolver doença periodontal, especialmente em diabéticos com um controlo metabólico reduzido^{33,34,36}. Por outro lado, o tratamento periodontal parece melhorar o controlo metabólico da diabetes, sugerindo assim uma relação bidirecional entre estas duas doenças. Neste contexto, já em 1993 Løe caracterizou a doença periodontal como sendo a sexta complicação da diabetes³⁷.

Os mecanismos fisiopatológicos que estão por detrás do elevado risco de doentes diabéticos desenvolverem doença periodontal não estão ainda bem claros. Deste modo, investigadores procuram mecanismos biológicos específicos que expliquem esta associação³⁴.

A doença periodontal tem sido atribuída a uma série de alterações funcionais e estruturais relacionadas com hiperglicemia, como sendo:

1. Espessamento das membranas basais dos vasos sanguíneos (microangiopatia), o que leva ao deterioramento da microcirculação nos tecidos periodontais e consequentemente uma diminuição do aporte de oxigénio e nutrientes aos tecidos e acumulação de metabolitos prejudiciais;
2. Alterações na função dos leucócitos polimorfonucleares, levando a dificuldades de adesão, de fagocitose e de quimiotaxia;
3. Alterações na proliferação dos fibroblastos gengivais e síntese de colagénio;
4. Aumento da atividade da collagenase;
5. Formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que ocorre quando existe

excesso de glicose disponível em contacto com proteínas estruturais. Uma vez formados, os AGEs ligam-se a um receptor celular específico – RAGE – que se encontra nas células endoteliais e nos monócitos. Esta ligação causa uma série de eventos pró-inflamatórios autossustentáveis, pois a ligação AGE-RAGE na superfície das células endoteliais induz a expressão de proteínas de adesão vascular (VCAM1) que atraem monócitos perpetuando a resposta inflamatória. A ligação AGE-RAGE altera também o fenótipo dos monócitos o que resulta num aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios como interleucina 1 beta, prostaglandina E2 fator de necrose tumoral;

6. Predisposição genética para infeções por gram-negativos^{33,34,36}.

Todos estes mecanismos podem levar a alterações no hospedeiro, que resultam na perda de fibras periodontais, perda de suporte de osso alveolar e eventual perda de dentes³⁴.

Objetivos

O objetivo deste estudo é avaliar a estrutura elemental no ligamento periodontal de ratos *Wistar* induzidos com diabetes. A avaliação foi feita através da caracterização elemental do ligamento periodontal pela técnica de fluorescência de raio-X.

Materiais e Métodos

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizaram-se 14 ratos *Wistar* machos com 8 semanas de idade no início do estudo e mantidos nas condições padrão de manutenção e manipulação, de acordo com a legislação em vigor.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=7 em cada grupo). O período experimental decorreu durante 4 semanas para os dois grupos. Grupo I: constitui o grupo controlo e foi mantido sem manipulação indutora de alterações. Grupo II: constitui o grupo teste ao qual foi induzida diabetes experimental. Esta indução foi realizada através de 65mg/kg de estreptozotocina administrada *per os* em dose única diluída em azeite, e reforçada com sacarose na água da bebida.

No final do período experimental os animais, grupo controlo e teste, foram sacrificados por sobredosagem anestésica. Foi realizada uma necrópsia completa com recolha de todos os órgãos e que permitiu excluir a presença de patologia não induzida. De cada animal foi analisada a mandíbula para estudo do ligamento periodontal na hemi-mandíbula direita e esquerda, perfazendo um total de 28 amostras.

As amostras foram analisadas pela técnica de fluorescência de raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX Figura 1). Em cada amostra foi escolhido um local entre dentes adjacentes Figura (2). Nesse local fez-se incidir o feixe de raio-X colimado (com uma área de 0,5x0,5mm), com energia de 15 keV e com tempo de exposição de 200s em cada uma das amostras. A energia de 15 keV tem capacidade de detetar elementos desde o sódio até ao ferro. Utilizou-se o gás inerte hélio (He) para que interferências relativas ao ar atmosférico, especificamente do gás árgon (Ar), fossem anuladas.



Figura 1: Equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.

A análise estatística foi feita com o programa estatístico RTM, sendo feita a média e desvio padrão das amostras para cada elemento do grupo de controlo e grupo de teste. Para comparar as médias das amostras entre o grupo de teste e o grupo de controlo foi feito o teste *t*-Student para um nível de confiança de 95%.

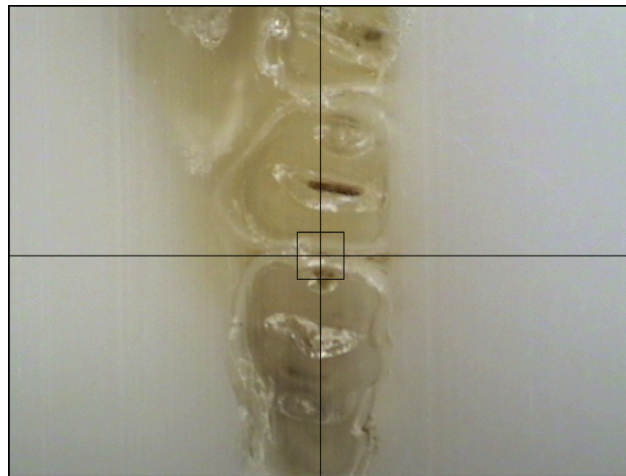


Figura 2: ilustração do local de incidência do feixe de raio-X. Fonte: imagem fotografada pelo autor.

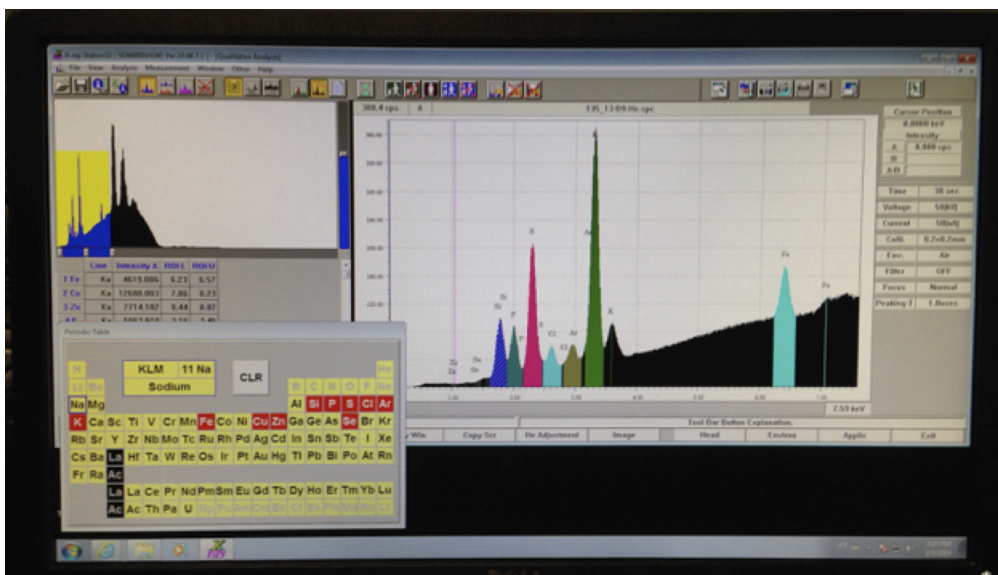


Figura 3: Software do equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.

Resultados

O valor médio das contagens por segundo está descrito de forma sucinta na tabela I. O valor médio das contagens por segundo para o Al foi de $3,06 \pm 1,72$ no grupo controlo e de $2,27 \pm 1,58$ no grupo teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O P mostrou um valor médio de contagens por segundo de $338,71 \pm 194,80$ no grupo controlo, descendo para $277,54 \pm 198,81$ no grupo de teste, não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa. O S mostrou um valor médio de contagens por segundo de $26,88 \pm 9,91$ no grupo controlo e no grupo de teste de $27,87 \pm 12,98$, não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa. O valor médio das contagens por segundo para o Cl foi de $7,57 \pm 6,23$ no grupo controlo e de $6,78 \pm 6,75$ no grupo teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O K mostrou um valor médio de contagens por segundo de $34,84 \pm 20,15$ no grupo controlo, descendo para $24,75 \pm 24,51$, não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa. O Ca obteve um valor médio de contagens por segundo de $4651,47 \pm 2324,48$ no grupo de controlo e de $3771,55 \pm 2344,13$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. Por último o Fe obteve os valores de $5,23 \pm 5,57$ no grupo de controlo e $4,16 \pm 3,43$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. Tomando o valor médio ajustado de cada elemento, conforme descrito no capítulo de materiais e métodos, temos as assinaturas elementais que passamos a descrever. Para o grupo controlo: Al3 P339 S27 Cl8 K35 Ca4651 Fe5. Para o grupo teste Al2 P278 S28 Cl7 K25 Ca3772 Fe4. (Tabela I).

O valor médio dos rácios está descrito de forma sucinta nas tabelas II, III, IV. O rácio

Tabela I: Média e desvio padrão dos valores obtidos nos grupos controlo e teste, com a respetiva significância estatística (valor de p).

Elementos	Controlo	Teste	valor de p
Al	3,06 ± 1,72	2,27 ± 1,58	0,24
P	338,71 ± 194,80	277,54 ± 198,81	0,34
S	26,88 ± 9,91	27,87 ± 12,98	0,44
Cl	7,57 ± 6,23	6,78 ± 6,75	0,31
K	34,84 ± 20,15	24,75 ± 24,51	0,26
Ca	4651,47 ± 2324,48	3771,55 ± 2344,13	0,32
Fe	5,23 ± 5,57	4,16 ± 3,43	0,40

médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/K foi de $0,15 \pm 0,08$ no grupo de controlo e de $0,11 \pm 0,11$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre P/K foi de $19,91 \pm 3,66$ no grupo de controlo e de $11,58 \pm 6,81$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre S/K no grupo de controlo foi de $1,75 \pm 3,22$ e no grupo de teste foi de $2,37 \pm 3,35$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/K foi de $0,35 \pm 0,15$ no grupo de controlo e de $0,21 \pm 0,15$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/K no grupo de controlo foi de $260,44 \pm 62,57$ e no grupo de teste foi de $175,24 \pm 119,76$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/K no grupo de controlo foi de $0,27 \pm 1,50$ e no grupo de teste foi de $0,23 \pm 0,33$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. Relativamente ao rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/P no grupo de controlo foi de $0,01 \pm 0,00$ e no grupo de teste foi de $0,01 \pm 0,01$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens

por segundo entre S/P no grupo de controlo foi de $0,42 \pm 1,10$ e no grupo de teste foi de $0,28 \pm 0,39$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/P no grupo de controlo foi de $0,12 \pm 0,07$ e no grupo de teste foi de $0,07 \pm 0,03$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre K/P no grupo de controlo foi de $0,02 \pm 0,01$ e no grupo de teste foi de $0,02 \pm 0,01$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/P no grupo de controlo foi de $15,49 \pm 3,84$ e no grupo de teste foi de $14,77 \pm 2,22$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/P no grupo de controlo foi de $0,17 \pm 0,55$ e no grupo de teste foi de $0,03 \pm 0,03$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/S no grupo de controlo foi de $0,09 \pm 0,10$ e no grupo de teste foi de $0,12 \pm 0,12$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre P/S no grupo de controlo foi de $11,53 \pm 13,74$ e no grupo de teste foi de $16,77 \pm 18,02$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/S no grupo de controlo foi de $0,58 \pm 1,27$ e no grupo de teste foi de $1,57 \pm 1,98$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre K/S no grupo de controlo foi de $0,21 \pm 0,39$ e no grupo de teste foi de $0,45 \pm 0,54$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/S no grupo de controlo foi de $149,54 \pm 163,43$ e no grupo de teste foi de $219,34 \pm 221,18$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/S no grupo de controlo foi de $0,15 \pm 0,15$ e no grupo de teste foi de $0,19 \pm 0,19$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. Tomando o valor médio ajustado de cada rácio, conforme descrito no capítulo de materiais e métodos, temos as assinaturas dos rácios elementais que passamos a descrever. Para o grupo controlo: AlK0,15 PK20 SK2 ClK0,35 CaK260 FeK0,27 Al/P0,01 S/P0,42

Cl/P0,12 K/P0,02 Ca/P14 Fe/P0,17 Al/S0,09 P/S12 Cl/S0,58 K/S0,21 Ca/S150 Fe/S0,15.
 Para o grupo teste: AlK0,11 PK12 SK2 ClK0,21 CaK175 FeK0,23 AlP0,01 SP0,28 ClP0,07
 KP0,02 CaP15 FeP0,03 AlS0,12 PS17 ClS2 KS0,45 CaS219 FeS0,19.

Tabela II: Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo controle.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0,15 ± 0,08	0,01 ± 0,00	0,09 ± 0,10
P	19,91 ± 3,66	-	11,53 ± 13,74
S	1,75 ± 3,22	0,42 ± 1,10	-
Cl	0,35 ± 0,15	0,12 ± 0,07	0,58 ± 1,27
K	-	0,02 ± 0,01	0,21 ± 0,39
Ca	260,44 ± 62,57	15,49 ± 3,84	149,54 ± 163,43
Fe	0,27 ± 1,50	0,17 ± 0,55	0,15 ± 0,15

Tabela III: Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo teste.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0,11 ± 0,11	0,01 ± 0,01	0,12 ± 0,12
P	11,58 ± 6,81	-	16,77 ± 18,02
S	2,37 ± 3,35	0,28 ± 0,39	-
Cl	0,21 ± 0,15	0,07 ± 0,03	1,57 ± 1,98
K	-	0,02 ± 0,01	0,45 ± 0,54
Ca	175,24 ± 119,76	14,77 ± 2,22	219,34 ± 221,18
Fe	0,23 ± 0,33	0,03 ± 0,03	0,19 ± 0,19

Tabela IV: Valores de p obtidos a partir dos coeficientes dos vários elementos com o potássio, fósforo e enxofre, entre o grupo controlo e teste.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0,44	0,28	0,36
P	0,26	-	0,48
S	0,49	0,30	-
Cl	0,47	0,47	0,49
K	-	0,04	0,45
Ca	0,29	0,28	0,49
Fe	0,19	0,18	0,34

Discussão

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da diabetes experimental no ligamento periodontal de ratos *Wistar*, através da caracterização elemental do ligamento periodontal pela técnica de fluorescência de raio-X. Esta técnica é simples, rápida, económica e não destrutiva, pois o facto de não ser necessário uma preparação prévia da amostra, foi uma vantagem na elaboração deste trabalho^{24,25}. No entanto, o facto desta técnica utilizar uma emissão de raio-X característico superior a 1KeV limitou a deteção de elementos que podiam ser importantes neste estudo como o carbono, oxigénio, azoto, oxigénio e o flúor. Em trabalhos futuros seria interessante usar uma técnica de caracterização elemental que conseguisse identificar elementos mais leves, tal como a *particle-induced gamma ray emission spectrometry*³⁸.

Através da aplicação da técnica de fluorescência de raio-X, foram identificados os seguintes elementos nas amostras: cálcio, fósforo, cloro, potássio, enxofre, ferro e alumínio.

O facto de ser estudada uma área reduzida, com alguma limitação visual na amostra, não nos permite eliminar à partida, a possibilidade de existir algum erro na localização da estrutura a analisar. Contudo, sabendo que foram encontrados valores semelhantes nas estruturas elementais presentes nos grupos estudados é de admitir que esse erro tivesse sido mínimo. O facto de não haver alterações significativas na presença de elementos permite-nos suspeitar que na doença em estudo não existam estas diferenças, pelo menos numa fase inicial. Seria interessante repetir o estudo em várias fases de evolução desta doença e ainda com situações patológicas a envolver o ligamento periodontal com registo histológico associado.

O facto de haver uma alteração quantitativa da relação entre o P e o K, é muito interessante e deve traduzir uma alteração estrutural e funcional muito inicial, pois foi a única encontrada. Este facto é ainda um indicador importante que pode ser usado para estudo da patogenia desta doença ao nível deste tecido.

Conclusões

De acordo com o estudo efectuado concluímos que é necessário uma repetição do estudo com uma amostra maior. Contudo parece-nos razoável aceitar desde já que as alterações patológicas se possam iniciar com alterações das relações entre os elementos existentes na estrutura. Parece-nos urgente focar a nossa atenção em alguns conceitos básicos para a patologia humana, com o conceito de lesão e alteração molecular e/ou elemental.

Propomos os seguintes conceitos:

Lesão: alteração morfológica que pode ser sempre documentada por registo histológico, sendo uma situação que traduz uma alteração da função, podendo ser reversível ou irreversível.

Alteração estrutural – funcional: alteração de uma estrutura do corpo humano não traduzida por alteração morfológica, documentada ao nível atómico e/ou molecular.

Assinatura elemental – conjunto de rácios entre os elementos de um tecido, num dado momento, avaliados em condições estandardizadas.

Com aumentar do nosso conhecimento e capacidade técnica é presumível que se passe rapidamente para um nível submicroscópico para o estudo da fisiologia e da patologia. O nível molecular já é hoje bastante comum começando agora a ser-mos levados para o nível atómico.

Bibliografia

- [1] J. a. E. Steiner, "A origem do universo," *Estudos Avançados*, vol. 20, pp. 231–248, Dec. 2006.
- [2] "Origin of the Elements." <http://www2.lbl.gov/abc/wallchart/chapters/10/0.html>. Accessed: 2015-05-17.
- [3] "How elements are formed." <http://sciencelearn.org.nz/Contexts/Just-Elemental/Science-Ideas-and-Concepts/How-elements-are-formed>. Accessed: 2015-05-17.
- [4] "Atoms Part 1: How Atoms Are Made." <http://sciexplorer.blogspot.pt/2012/10/atoms-part-1-how-atoms-are-made.html>. Accessed: 2015-05-17.
- [5] "Origem dos elementos quimicos." <http://nautilus.fis.uc.pt/cec/origem/simul/index.html>. Accessed: 2015-05-17.
- [6] A. Fischer, D. Wiechuła, and C. Przybyła-Misztela, "Changes of Concentrations of Elements in Deciduous Teeth with Age," *Biological Trace Element Research*, vol. 154, pp. 427–432, July 2013.
- [7] J. A. R. Atance, *Bioquímica Bucodental*. Madrid: Editorial Sintesis.
- [8] E. Kijak, E. Rosato, K. Knapczyk, and E. Pyza, "Drosophila melanogaster as a model system of aluminum toxicity and aging.," *Insect science*, vol. 21, pp. 189–202, Apr. 2014.
- [9] C. Exley and M. J. Mold, "The binding, transport and fate of aluminium in biological cells.," *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, vol. 30, pp. 90–5, Apr. 2015.
- [10] I. Baranowska, L. Barchański, M. Bak, B. Smolec, and Z. Mzyk, "X-ray fluorescence spectrometry in multielemental analysis of hair and teeth," *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 13, no. 6, pp. 639–646, 2004.

- [11] F. O. Falla-Sotelo, M. A. Rizzutto, M. H. Tabacniks, N. Added, M. D. L. Barbosa, R. A. Markarian, A. Quinelato, M. Mori, and M. Youssef, "Analysis and discussion of trace elements in teeth of different animal species," *Brazilian Journal of Physics*, vol. 35, pp. 761–762, Sept. 2005.
- [12] N. D. Shashikiran, V. V. Subba Reddy, and M. C. Hiremath, "Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary and permanent teeth by atomic absorption spectrophotometry: an in vitro study.," *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*, vol. 18, pp. 157–62, Jan. 2007.
- [13] M. Riyat and D. C. Sharma, "Analysis of 35 inorganic elements in teeth in relation to caries formation.," *Biological trace element research*, vol. 129, pp. 126–9, Jan. 2009.
- [14] C. Oprea, P. Szalanski, M. Gustova, I. Oprea, and V. Buzguta, "Multivariate comparison of elemental concentrations in human teeth," *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 67, pp. 2142–2145, Dec. 2009.
- [15] C. Oprea, P. Szalanski, M. Gustova, I. Oprea, and V. Buzguta, "XRF detection limits for dental tissues of human teeth," *Vacuum*, vol. 83, pp. S166–S168, May 2009.
- [16] M. a. Amr and a. F. Helal, "Analysis of Trace Elements in Teeth by ICP-MS: Implications for Caries," *Journal of Physical Science*, vol. 21, no. 2, pp. 1–12, 2010.
- [17] A. T. Jang, J. D. Lin, R. M. Choi, E. M. Choi, M. L. Seto, M. I. Ryder, S. A. Gansky, D. A. Curtis, and S. P. Ho, "Adaptive properties of human cementum and cementum dentin junction with age.," *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 39, pp. 184–96, Nov. 2014.
- [18] Z. Z. Çiftçi, Z. Kırzioğlu, M. Nazıroğlu, and O. Özmen, "Effects of prenatal and postnatal exposure of Wi-Fi on development of teeth and changes in teeth element concentration in rats. [corrected].," *Biological trace element research*, vol. 163, pp. 193–201, Feb. 2015.
- [19] C. Gonçalves and V. Bairros, *Histologia Texto e Imagens - Histologia Histogénese Organogénese*. Imprensa Universidade Coimbra, 2^a ed., 2007.

-
- [20] J. Lindhe, T. Karring, and N. P. Lang, *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Blackwell Publishing, 5^a ed., 2008.
- [21] F. A. Duck, *Physical Properties of Tissue*. London: Academic Press, 1990.
- [22] G. L. Clark, *Physical Methods in Chemical Analysis*. Academic Press Inc. Publishers, 1956.
- [23] A. Moreno, *Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques*. PhD thesis, 2013.
- [24] A. R. B. Silva, *Avaliação morfológica e elemental num modelo experimental de intoxicação com metais pesados*. PhD thesis, 2014.
- [25] R. Silva and A. Trindade, “Fluorescência de Raio-X,” *Revista Portuguesa de Terapêutica Integrada*, vol. Junho, 2014.
- [26] S. A. Skoog and J. J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College Publishing, International Edition, fourth ed., 1992.
- [27] W. H. Organization, “Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus.” (Geneva), 1999.
- [28] W. H. Organization, “Global Status Report on noncommunicable diseases 2014,” tech. rep., 2014.
- [29] Sociedade Portuguesa de Diabetologia, “Diabetes: Factos e Números. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes.” tech. rep., 2014.
- [30] American Diabetes Association, “Diagnosis and classification of diabetes mellitus,” *Diabetes care*, vol. 37 Suppl 1, pp. S81–90, Jan. 2014.
- [31] American Diabetes Association, “2. Classification and Diagnosis of Diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 38, no. January, pp. S8–S16, 2015.

- [32] American Diabetes Association, "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus," *Diabetes care*, vol. 26 Suppl 1, pp. S5–20, Jan. 2003.
- [33] "The relationship between oral health and diabetes mellitus," *Journal of the American Dental Association (1939)*, vol. 139 Suppl, pp. 19S–24S, Oct. 2008.
- [34] A. M. L. Pedersen, "Diabetes Mellitus and Related Oral," *Oral Biosciences & Medicine*, vol. 1, no. 4, pp. 229–248, 2004.
- [35] J. A. Ship, "Diabetes and oral health: an overview.," *Journal of the American Dental Association*, vol. 134 Spec N, pp. 4S–10S, Oct. 2003.
- [36] B. L. Mealey and T. W. Oates, "Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases," *Journal of Periodontology*, vol. 77, no. August, pp. 1289–1303, 2006.
- [37] H. Loe, "Periodontal disease: The sixth complication of diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 16, no. January, pp. 329–334, 1993.
- [38] M. Hyvönen-Dabek, "Proton-induced prompt gamma-ray emission for determination of light elements in human bone," *Journal of Radioanalytical Chemistry*, vol. 63, pp. 367–378, Sept. 1981.