

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Discipline Chirurgiche e Oncologiche
Sezione di Scienze Stomatologiche "G.Messina" - SSD MED/28

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE STOMATOLOGICHE - XXII CICLO

STUDIO MORFOLOGICO DEL
MICROCIRCOLO ORALE NEL PAZIENTE
DIABETICO

Dott. ANTONINO CACIOPPO

TUTOR:

Ch.mo Prof. PIETRO MESSINA

COORDINATORE DEL CICLO:

Ch.ma Prof.ssa GIUSEPPINA CAMPISI

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

INTRODUZIONE	5
II DIABETE MELLITO	9
Glicazione e danni microcircolatori.....	16
LA VIDEOCAPILLAROSCOPIA	20
ED IL MICROCIRCOLO DEL CAVO ORALE	20
Cenni anatomo-patologici del microcircolo della mucosa orale.....	23
Parametri morfologici (o Statici)	26
MATERIALI E METODI	31
RISULTATI.....	38
Analisi Statistica	39
DISCUSSIONE	44
CONCLUSIONI	49
APPENDICE FOTOGRAFICA/CAPILLAROSCOPICA.....	52
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUZIONE

Il diabete mellito, considerato oggi una malattia sociale a carattere cronico/degenerativo, comprende un gruppo di disordini metabolici caratterizzati da uno stato iperglicemico [1]. Questa affezione può derivare dall'alterata secrezione o dall'alterata captazione ed azione periferica dell'insulina¹. Gli individui affetti dalla malattia diabetica vanno incontro a complicanze microvascolari e macrovascolari che costituiscono un peso, in termini medici ed economici, per l'individuo e l'intera società. Tra le patologie più diffuse in Italia e nel mondo², il diabete è forse la patologia che maggiormente grava sul Sistema Sanitario Nazionale (SSN). Non la malattia in sé ma le sue complicanze costituiscono un peso, financo economico, per la società.

Consapevole dei rischi collegati al diabete, la comunità medica internazionale ha ritenuto necessario concentrarsi su un nuovo obiettivo da affiancare alla ricerca di nuove terapie farmacologiche e protocolli terapeutici. Si tratta della diagnosi precoce della patologia

¹ *American Diabetes Association 2007. Diagnosis and classification of diabetes mellitus.*

² L'OMS nel 2000 ha stimato la presenza di 170 milioni di diabetici nel mondo. L'aumento stimato porterà secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità a oltre 300 milioni di diabetici nel 2030.

diabetica e la prevenzione delle complicanze e delle patologie secondarie³.

Tra gli effetti secondari del diabete quello che più da vicino interessa l'odontoiatra è la parodontopatia diabetica. Differenti studi hanno supportato lo stretto legame tra diabete e malattia parodontale, dovuto alle alterazioni della microcircolazione del periodonto e della mucosa orale⁴. Lo stesso dicasi, nel campo della medicina orale e della clinica odontostomatologica, per ciò che riguarda le mucositi atrofiche e le sovrainfezioni micotiche, associate alla patologia diabetica [18-35].

La figura e il ruolo dell'odontoiatra sono profondamente mutati negli ultimi anni. Il campo d'indagine si è esteso alla clinica odontostomatologica, così che l'odontoiatra è sempre più coinvolto nel percorso medico diagnostico-terapeutico di patologie metaboliche sistemiche su base sia autoimmune che infiammatoria cronica. Il diabete mellito rientra tra le patologie in cui il ruolo dell'odontoiatra risulta centrale a livello diagnostico e terapeutico.

Un'altra cognizione assunta dalla medicina contemporanea è che l'approccio multidisciplinare al paziente diabetico risulta certamente vincente. Questo lavoro vuole essere ciò che gli anglosassoni definirebbero *one step forward* ovvero 'un passo in avanti' in un cammino intrapreso alla fine degli anni '90 dal prof. Pietro Messina, docente ordinario presso l'Università degli Studi di Palermo, e dal ricercatore Giuseppe Alessandro Scardina. Molti sono stati gli studi videocapillaroscopici, condotti dal gruppo di ricerca Palermitano, con

³ Il primo report dell'OMS sul diabete è datato 1965. Da allora l'Organizzazione mondiale della sanità ha ridefinito le linee guida diverse volte fino ad arrivare al più recente testo in materia di Diabete mellito: *Prevention of diabetes and its complications (2008)*.

⁴ Emrich et al. 1991, American Academy of Periodontology 2000, Ryan et al. 2003, Borrell & Papapanou 2005, Lalla et al. 2006

i quali si è cercato di investigare sulle caratteristiche morfologiche del microcircolo del cavo orale in relazione a patologie sistemiche e distrettuali [32-33-45-46-47-50-5-52-53]. I risultati, talvolta entusiasmanti talaltra meno, si sono dimostrati pur sempre significativi.

Tra i mezzi diagnostici a disposizione dello specialista, già da quasi un decennio si è iniziato a intravedere una nuova metodica, nella quale il succitato team del Prof. Pietro Messina ha creduto fin da subito: la videocapillaroscopia orale. L'audace sfida che questa metodica si pone e ci pone davanti è di poter leggere lo stato, patologico o non, dei tessuti molli del cavo orale. L'esame capillaroscopico non solo risulta rapido, facilmente eseguibile e dal costo accessibile ma garantisce risultati ogni giorno più affidabili. Si ottiene una sorta di fotografia, in vivo e non invitro, della componente vascolare della mucosa orale.

I risultati fino ad oggi raggiunti riguardo a patologie quali il Lichen Planus Orale, la Sclerodermia, la Tiroidite di Hashimoto, la Sindrome di Sjogren, fanno ben sperare e fungono al contempo da base scientifica e argomento motivazionale per un nuovo protocollo di ricerca sulla patologia diabetica. Altrettanto incoraggiante risulta la comparazione dei quadri videocapillaroscopici con l'analisi microscopica anatomo-patologica condotta su prelievi biotici. Questo accostamento ha messo in evidenza una totale sovrapposibilità delle alterazioni microcircolatorie rilevabili nell'uno e nell'altro esame.

Nel 2009 due reumatologi tedeschi, Lambova e Ladner, affermarono audacemente che "i cambiamenti capillaroscopici nelle patologie autoimmuni del tessuto connettivo sono specifici e differiscono in maniera significativa da quelli che possono essere

riscontrati in altre patologie”⁵. Auspicio e scopo di questo lavoro di ricerca è poter aggiungere a quest’affermazione che ciò vale anche per il Diabete Mellito.

Il *movens* di questo studio è la voglia di arrivare, un giorno, a definire un nuovo approccio alla diagnosi precoce ed al monitoring terapeutico del paziente odontostomatologico. Sia che questo sia affetto da patologie che interessano il distretto orale, che anche da patologie sistemiche direttamente od indirettamente coinvolte nello scompaginamento della rete microvascolare periferica.

Lo scopo di questo studio è di evidenziare ed oggettivare possibili alterazioni nel microcircolo orale nel paziente diabetico, avvalendoci della videocapillaroscopia a sonda ottica (VCSO). Inoltre arrivare a definire l’identikit capillare e micro circolatorio invivo della patologia diabetica si unisce a un altro obiettivo: poter pensare al pattern capillaroscopico del paziente diabetico come una sorta di impronta digitale della patologia e del suo stadio nel lungo decorso clinico.

⁵ The specificity of capillaroscopic pattern in connective autoimmune diseases. A comparison with microvascular changes in diseases of social importance: arterial hypertension and diabetes mellitus. Sevdalina Nikolova Lambova Æ Ulf Müller-Ladner. Mod Rheumatol (2009) 19:600–605.

I

IL DIABETE MELLITO

Il termine medico Diabete si riferisce ad un gruppo di disordini metabolici cronici caratterizzati da una comune instabilità del livello ematico di glucosio. Il nome diabete, derivante dal greco antico *diabainein*, letteralmente 'attraversare', si riferisce al sintomo più caratteristico di questa patologia: la poliuria, ovvero l'eccessiva produzione di urina.

Come fu chiaro già nell'antichità⁶, esistono sostanzialmente due manifestazioni cliniche del diabete: la prima caratterizzata dalla presenza di glucosio nelle urine, venne definita mellito (dal latino *mel*: miele, dolce) dal medico inglese Thomas Willis nel 1675. Il nome deriva dalla constatazione che il sangue e le urine dei pazienti diabetici hanno un sapore dolce, caratteristica peraltro già nota agli Indiani, ai Greci, ai Cinesi e agli Egiziani. La seconda variante clinica fu definita insipido per il fatto che le urine non avevano il caratteristico gusto dolce.

⁶ Il primo riferimento scritto su un qualcosa assimilabile al diabete lo si ritrova verso il 1500 a.C. su un papiro egiziano di Ebers; fu successivamente Areteo di Cappadocia nel 100 d.C. circa a descrivere i particolari della patologia; Galeno (129-200) la descriveva come una malattia che provocava danni ai reni; la prima divisione per quanto riguarda i due tipi principali di diabete (il tipo 1 e il tipo 2) è stata eseguita da Avicenna (980-1037) intorno all'anno 1000; nel Medioevo in tutta Europa i medici facevano diagnosi di DM assaggiando letteralmente le urine dei pazienti, pratica che può essere ancora apprezzata in una grande varietà di opere d'arte del periodo Gotico; nel 1774, grazie a Matthew Dobson (1732-1784) si scoprì che il sapore dolce delle urine era dovuto al glucosio in esse contenuto.

Le due forme di diabete, mellito e insipido, sono accomunate solo dalla poliuria e costituiscono due patologie diverse dal punto di vista sia eziopatogenetico che clinico.

Comunemente, oggi, ci si riferisce al diabete intendendo il Diabete Mellito (DM). Due sono le forme più conosciute: il DM di tipo 1 (DM1), noto anche come diabete giovanile, è caratterizzato essenzialmente da una riduzione dell'insulina nonché da una ridotta funzionalità delle cellule β del pancreas; il DM di tipo 2 (DM2), è, d'altronde, la forma più comune e diffusa. Proprio quest'ultima forma di diabete mellito è stata presa in considerazione per questa tesi di dottorato.

Il DM è considerato non patologia ma sindrome dismetabolica, che coinvolge e, allo stesso tempo, sconvolge il metabolismo glucidico, proteico, lipidico, nonché il ricambio idrico ed elettrolitico. È essenzialmente caratterizzata da un ridotto utilizzo periferico del glucosio a livello tissutale, conseguente a una carenza, assoluta o relativa, dell'insulina. Le variazioni della concentrazione ematica di questo ormone, secreto dalle cellule β del pancreas endocrino (isole del Langherans), sono correlate in maniera più o meno evidente ad un patognomonico aumento della normale concentrazione di glucidi nel sangue.

I criteri per porre diagnosi di Diabete sono stati più volte ridefiniti negli anni e oggi si ritiene siano i seguenti:

- sintomi clinici di diabete (poliuria, polidipsia, perdita di peso inspiegabile) associati a un valore di glicemia casuale, cioè indipendentemente dal momento della giornata, $\geq 200\text{mg/dl}$;
- glicemia a digiuno $\geq 126\text{mg/dl}$ (il digiuno è definito come mancata assunzione di cibo da almeno 8 ore);

- glicemia ≥ 200 mg/dl durante una curva da carico di glucosio (OGTT). Si noti che il test dovrebbe essere effettuato somministrando 75g di glucosio valutandone l'andamento della concentrazione ematica.

Esistono stadi clinici definiti di pre-diabete in cui la glicemia non supera i livelli stabiliti per la diagnosi di diabete, ma che comunque non costituiscono una condizione di normalità. In questi casi si parla di Alterata Glicemia a Digiuno (IFG), quando i valori di glicemia a digiuno sono compresi tra 110 e 125 mg/dl, e di Alterata Tolleranza al Glucosio (IGT), quando la glicemia due ore dopo il carico di glucosio è compresa tra 140 e 200 mg/dl. Si tratta di alterazioni che indicano un elevato rischio di sviluppare la malattia diabetica anche se non rappresentano una situazione tassativamente patologica. Spesso sono associati a sovrappeso, dislipidemia e/o ipertensione e si accompagnano a un maggior rischio di eventi cardiovascolari. Questi due criteri, IFG e IGT, sono oggi presi in considerazione come elementi indispensabili per una diagnosi precoce della malattia diabetica.

Esistono differenti tipologie di DM classificate in base alla loro differente eziologia:

1. Diabete Mellito di tipo 1: caratterizzato da un danno a carico delle cellule β del pancreas che producono insulina, e, conseguenzialmente, da una ridotta produzione dell'ormone ipoglicemizzante; esistono due varianti di tale stato patologico:

- DM 1A - distruzione su base autoimmune delle cellule β -insulari, accomunabile ad altre patologie su base autoimmune;

- DM 1B - distruzione idiopatica, non riconducibile a particolari eventi o stadi patologici o comportamenti anomali del sistema immunitario;

2. Diabete Mellito di tipo 2: condizione di iperglicemia caratterizzata da alterata secrezione di insulina o dallo sviluppo di fenomeni di insulinoresistenza periferica, in cui la secrezione insulinica è normale ma il problema risiede a livello dei recettori specifici o degli enzimi da essi coinvolti; l'iperglicemia è consequenziale ad un ridotto utilizzo periferico del glucosio;

3. MODY (*Maturity Onset of the Diabetes of the Youngs*): costituito da sei sottotipi (1÷6) di alterazioni genetiche determinanti deficit nella funzione delle cellule β (v. tab.1);

Sottotipo	Coinvolgimento/ Gene alterato
MODY 1	HNF
MODY 2	Glucochinasi
MODY 3	HNF-1 alfa
MODY 4	IPF1
MODY 5	HNF-1 beta
MODY6	NeuroD1

Tabella 1. Classificazione dei sottotipi di diabete MODY.

4. LADA (Late Autoimmune Diabetes in Adults);

5. Diabete Mellito Gestazionale (DM-G): nel 2-5% delle gravidanze capita che la madre sviluppi una condizione di DM. Tale

evento risulta essere del tutto transitorio: si sviluppa solitamente alla fine del secondo trimestre di gestazione e si risolve spontaneamente dopo la gravidanza con la semplice attenzione alla dieta e all'attività fisica

6. Diabete Monogenico legato alla mutazione Kir6.2. Di recente scoperta, è una rara forma di diabete giovanile legato ad una mutazione genetica. Effetto ultimo di questa forma è la mancata chiusura dei canali potassio nelle cellule β del Pancreas endocrino in risposta all'aumento dell'ATP, indispensabile per la normale secrezione dell'insulina, prodotta normalmente in questi soggetti. Tale tipo di diabete è risultato sensibile a terapia con Sulfoniluree, una tra le categorie più "antiche" di farmaci antidiabetici per via orale;

7. Diabete Mellito secondario ad altre patologie:

- Malattie del pancreas esocrino (pancreatiti) con secondario coinvolgimento della parte endocrina
- Endocrinopatie (acromegalia, sindrome di Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, ipertiroidismo, somatostatinoma, aldosteronoma)
- Indotto da farmaci quali: Vacor, pentamidina, acido nicotinic, glucocorticoidi, ormoni tiroidei, diazossido, β -agonisti, tiazidici, fenitoina, interferon α , inibitori delle proteasi, clozapina, β -bloccanti
- Secondario a Infezioni quali: rosolia congenita, citomegalovirus e coxsackievirus
- Secondario a Patologie genetiche, ovvero: sindrome di Down, sindrome di Turner, corea di Huntington, sindrome di Laurence-Moon-Biedl e porfiria

Da un punto di vista epidemiologico, il DM è considerato una malattia sociale ed esercita un notevole impatto sulla salute pubblica per l'entità della sua diffusione e la gravità delle sue complicanze. Secondo i dati raccolti negli ultimi anni dai medici diabetologi nel documento "Annali AMD 2009" e i più recenti dati Istat datati 20 dicembre 2009 ("Annuario Statistico ISTAT 2009") la prevalenza del diabete nella popolazione italiana si aggirerebbe attorno al 4,8 % ed in Sicilia, in particolare, raggiunge il 5,8%. Nel complesso in Italia la popolazione di diabetici dovrebbe essere di circa 2 milioni e 600 mila persone. Nella fascia d'età 45-74 anni la prevalenza è maggiore fra gli uomini, mentre nella fascia oltre i 75 anni è molto più alta fra le donne. Per quanto riguarda la distribuzione geografica, l'area con la percentuale più alta è il Mezzogiorno, con un tasso del 5,2%, seguita dal Centro con il 4,5% e dal Nord con il 3,9%. I pazienti diabetici di tipo 1 sono circa il 5.7 % della popolazione dei diabetici (circa 150.000). La porzione più rilevante è data dai diabetici di tipo 2 (circa 2 milioni e 400 mila). Tra questi sono più gli uomini (53.1%) delle donne (46.9 %).

La vera spada di Damocle del diabetico sta nel rischio che la sua patologia possa degenerare nelle complicanze, spesso legate alla durata e allo scompenso metabolico. Come si apprende dalla Legge 115/1987 (*Disposizioni per la prevenzione e la cura del diabete mellito*) e dalla Dichiarazione di Saint Vincent del 1989 (OMS e IDF), ciò che assume maggiore rilevanza medica in tema di diabete sono la prevenzione e diagnosi precoce e la prevenzione delle complicanze.

Tra le complicanze possiamo distinguere le complicanze acute o a breve termine:

- la cheto acidosi diabetica, una concentrazione eccessiva di corpi chetonici nel sangue dovuta alla carenza insulinica e al conseguente eccesso di glucagone tipica del DM di tipo 1
- lo stato iperosmolare glicemico, caratteristico del DM di tipo 2, si osserva per lo più in pazienti anziani nei quali la condizione diabetica è aggravata da eventi ricorrenti (per es. infezioni o ictus cerebrale) e la capacità di bere è menomata così da rendere impossibile il compenso della diuresi osmotica

e le complicanze croniche o a lungo termine:

- macroangiopatia diabetica, ovvero la tendenza a sviluppare, più precocemente e più intensamente, fenomeni di aterosclerosi. L'eccesso di glucosio nel sangue favorisce la glicazione (che, a differenza della glicosilazione, è un processo non enzimatico) delle lipoproteine a bassa densità (LDL). Questo fenomeno è alla base della formazione delle placche ateromatose
- ulcera diabetica: frequente lo sviluppo di piaghe in prossimità degli arti inferiori dovuto a sfregamenti (es. scarpe troppo strette), per questo il diabetico deve curare moltissimo la propria igiene
- malattia di Dupuytren
- sindrome del tunnel carpale
- glaucoma

Trattazione a parte merita la microangiopatia diabetica che porta a quelle che comunemente sono le complicanze cliniche più evidenti del DM:

- la retinopatia diabetica che affligge la retina. Complicanza visiva molto pericolosa, la retinopatia comporta negli adulti la perdita totale della vista. L'esame del fondo oculare è l'unico esame per comprendere il suo manifestarsi che può essere lento o rapido
- la nefropatia diabetica, affligge il rene. Causa sovente è l'insufficienza renale inoltre la malattia di base non si mostra fino a quando si riscontra o l'insufficienza o la sindrome nefrosica
- la neuropatia diabetica, affligge il sistema nervoso periferico in diverse forme

GLICAZIONE E DANNI MICROCIRCOLATORI

In presenza di iperglicemia, i processi metabolici delle cellule endoteliali vanno incontro ad un eccessivo stress ossidativo che aumenta a sua volta la glicazione non-enzimatica e l'ossidazione delle proteine. L'eccesso di glucosio nel sangue favorisce quindi la glicazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), processo alla base dell'aterosclerosi (macroangiopatia) e dei fenomeni microangiopatici periferici.

La glicazione proteica indica la reazione mediante la quale gli zuccheri si legano ad alcuni gruppi di proteine. Il processo si svolge in più stadi, con la formazione in un primo momento del prodotto di Amadori e, successivamente, di prodotti finali di glicazione avanzata. I prodotti di glicazione avanzata, una volta fissati alle proteine dell'organismo, sono responsabili di alcuni danni ai tessuti (complicanze periferiche). Il primo stadio della glicazione (prodotto di Amadori) non provoca danni ed è possibile misurarne la quantità, in modo da poter essere impiegato come marcatore. La reazione di glicazione è una reazione non-enzimatica: dipende cioè solamente dalla quantità di glucosio nel sangue, dalla quantità di proteine, dalla permeabilità delle cellule al glucosio e dai gruppi amminici liberi. I prodotti di glicazione formano ponti intermolecolari anomali (i cosiddetti *cross links*), si legano a specifici recettori e si accumulano anche dentro le cellule. Un esempio è fornito dal collagene che determina un ispessimento dei tessuti del rene (nefropatia diabetica). La strategia di prevenzione e cura deve mirare a inibire la formazione di questi prodotti. La glicazione proteica, in quanto dipendente dal contenuto di zuccheri nel sangue, costituisce anche un marcatore di valutazione del controllo metabolico. Ciò avviene mediante la misurazione dell'emoglobina glicosilata GHb, in quanto lo zucchero si lega alla parte proteica dell'emoglobina. I valori si normalizzano in circa 4-6 settimane. L'aumento di livello a seguito d'iperglicemia si rivela dopo circa 1 – 4 settimane; per questo il valore dell'emoglobina è rappresentativo della situazione media delle ultime 4/8 settimane.

A livello della mucosa orale e parodontale il danno microcircolatorio è consequenziale alla glicazione delle proteine. Si estrinseca clinicamente con una aumentata tendenza alla atrofia

tissutale (soprattutto sul dorso della lingua) e con una aumentata tendenza allo sviluppo della malattia parodontale, cui è complice anche l'aumento del glucosio nel fluido sulcolare.

Da un'attenta revisione della letteratura internazionale emerge che esistono diversi studi condotti su pazienti diabetici di tipo 1 e 2 atti ad evidenziare le variazioni circolatorie cutanee. A questi si aggiungono: studi condotti tramite l'ausilio dell'angiometria, del doppler, della capillaroscopia sul letto peri-ungueale e su quello congiuntivale. Non mancano neanche studi che hanno dimostrato come la variazione del diametro e della tortuosità dei capillari siano riscontrabili nella patologia diabetica in modo proporzionale alla durata dello scompenso metabolico.

Altri studi, condotti con metodiche differenti quali ionoforesi, ossigeno transcutaneo e capillaroscopia, hanno evidenziato come le modificazioni del microcircolo abbiano aspetto simile in patologie diverse quali il diabete, l'aterosclerosi, l'ipercolesterolemia, l'insufficienza venosa e altre patologie cardiovascolari.

È emerso da altri studi ancora come spesso la modificazione del microcircolo sia precedente alla stessa angiopatia retinica, considerata in passato uno dei segni precoci della malattia diabetica. Questo mutamento si può evidenziare in vivo tramite metodica capillaroscopica, nella fattispecie applicata alla mucosa congiuntivale. Non risultano, ad oggi, studi in vivo sul microcircolo orale che dimostrino una corrispondenza tra variazioni del letto capillare e patologia diabetica.

È questo che mi ha spinto ad approntare un protocollo di ricerca che sfruttasse le potenzialità della videocapillaroscopia orale, per evidenziare le modificazioni del microcircolo, qualora presenti, in

virtù anche dei progressi che tale metodica ha effettuato negli ultimi anni.

Grazie alle peculiari caratteristiche anatomiche ed istologiche e alla sua facile accessibilità, la mucosa orale si propone come sede preferenziale per l'esame capillaroscopico che, alla luce dei risultati di questo studio, si appresta a diventare un utile mezzo di diagnosi precoce e di monitoraggio della patologia diabetica.

II

LA VIDEOCAPILLAROSCOPIA ED IL MICROCIRCOLO DEL CAVO ORALE

Il DM sovverte in modo irreversibile la normale morfologia e le fisiologiche caratteristiche emodinamiche del microcircolo periferico. Le potenzialità di un'indagine invivo che potesse dare un'idea del danno periferico, attraverso lo studio del letto vasale terminale, furono comprese già negli anni '70. Negli anni '80 molti furono gli studi che riuscirono a dimostrare la validità di metodiche capillaroscopiche nel determinare in maniera precoce quali fossero i reali danni tissutali e microcircolatori consequenziali alla malattia diabetica. Le sedi investigate con maggior attenzione e con maggior successo furono essenzialmente tre:

1. *Il fondo oculare.* La lettura del microcircolo sottostante la retina si è dimostrata di duplice importanza: da un lato dà contezza dei cambiamenti microangiotettonici e microcircolatori nel paziente diabetico a livello periferico; dall'altro lato costituisce un mezzo di monitoraggio del danno retinico, uno dei sintomi più frequenti del DM e una delle patologie secondarie più invalidanti insieme alla nefropatia ed alla neuro-microangiopatia.

2. *La mucosa congiuntivale.* Il microcircolo congiuntivale si mostra di valido aiuto nel monitorare la microangiopatia diabetica e costituisce una sede facilmente accessibile dal medico e di facile lettura. L'esame non è estremamente invasivo e soprattutto risulta altamente attendibile

3. *La plica periungueale.* È forse il distretto più a lungo indagato, vista l'estrema facilità dell'esame capillaroscopico. Sfruttata in passato ma non ancora abbandonata da reumatologi e diabetologi, la lettura del microcircolo periungueale ha il doppio scopo di stimare il danno microcircolatorio periferico, secondario alla glicazione dell'emoglobina, e di valutare invivo le risposte al cold-stress tipiche del fenomeno di Reynauld. I limiti di questa sede sono provocati da due ordini di ragioni: innanzitutto dall'estrema vulnerabilità della plica unguale, che è soggetta ai traumi lavorativi o da attività manuali ripetute e continuate. La seconda ragione riguarda la ridotta trasparenza della plica visto il suo caratteristico rivestimento corneo (presente, per quanto sottile ed esiguo rispetto alla cute). In più la zona unguale, estremità terminale di un arto (inferiore o superiore), risulta maggiormente suscettibile ai cambiamenti della temperatura ambientale e tende a falsare facilmente il quadro capillaroscopico.

In questo studio la sede prescelta per l'indagine capillaroscopica è stata la mucosa orale e, più in particolare, la mucosa di rivestimento labiale e geniena e quella masticatoria/gengivale. Quest'ultima,

benché cheratinizzata, riesce ad essere facilmente indagabile ed ugualmente trasparente quanto basta affinché si riesca a leggere bene il microcircolo del parodonto superficiale. Le caratteristiche della mucosa orale sono ben note: essa è formata da un epitelio pluristratificato schematicamente suddivisibile in cinque strati sovrapposti (da quello basale a quello superficiale), dallo spessore variabile a seconda della localizzazione e caratterizzato da assenza di strato corneo (nella mucosa di rivestimento labiale, geniena, del pavimento e del palato molle) o dalla presenza di uno strato corneo ridotto in dimensioni rispetto a quello cutaneo (nella mucosa masticatoria e nella mucosa di rivestimento del palato duro); o ancora dalla presenza di uno strato corneo ben rappresentato e con annessi organi di senso superficiali (mucosa specializzata del dorso linguale). Caratteristica comune alla mucosa di rivestimento e a quella masticatoria è l'ottima traslucenza, intesa come capacità di far passare la luce. Questa caratteristica si traduce in un'ottima visibilità del letto capillare ed è alla base della scelta della mucosa orale quale sede preferenziale per l'esame capillaroscopico. In questa tipologia d'esame la lettura del microcircolo si basa, da un lato, sulla capacità dei tessuti indagati di far passare la luce emessa dalla sonda capillaroscopica attraverso gli strati dell'epitelio di rivestimento fino al sottostante tessuto connettivo mucosale. Dall'altro si fa affidamento sulla capacità degli stessi tessuti di far passare, altrettanto facilmente, la radiazione luminosa riflessa (dalle cellule endoteliali e connettivali dei capillari e del tessuto connettivo interstiziale) che verrà poi letta dalla videocamera presente nella sonda stessa (con un meccanismo di foto-impressione istantanea e momentanea dei pixel del sensore CCD). Tanto più è tralucente il tessuto esaminato, quanto più chiare e

nitide saranno le immagini dei quadri capillaroscopici sui quali effettuare poi le indagini morfologiche e le misurazioni a carico delle anse capillari terminali.

Studi effettuati negli ultimi anni, intesi a valutare invivo le caratteristiche del microcircolo periferico in pazienti affetti da patologie sistemiche su base autoimmune, infiammatoria cronica, etc, hanno permesso alla videocapillaroscopia orale di entrare a pieno diritto tra gli esami diagnostici indispensabili nell'ambito delle vasculopatie e in particolare nelle microangiopatie. Le lesioni anatomo-patologiche a carico dell'unità microvascolare svolgono una funzione patogenetica estremamente importante, se non addirittura fondamentale, nel condizionare il decorso e l'eventuale aggravamento sia di microangiopatie propriamente dette (vasculiti), sia di macroangiopatie [3-9-12-14-29]. Tutto ciò sottolinea il grande valore assunto da alcuni esami strumentali quale complemento all'indagine clinica, proprio perché capaci di fornire elementi validi per una più completa e minuziosa valutazione morfologica e funzionale delle condizioni circolatorie distrettuali.

CENNI ANATOMO-PATOLOGICI DEL MICROCIRCOLO DELLA MUCOSA ORALE

Descrivere quelli che sono gli elementi anatomici e fisiologici della microcircolazione, prima ancora di entrare nel mondo del microcircolo, è di fondamentale importanza per comprendere i limiti e

l'utilità dell'indagine capillaroscopica. La classica unità capillare, oggi nota come unità microvascolare, appare costituita da:

- una componente arteriosa,
- una componente capillare,
- una componente venosa,
- incostante componente anatomica arterioso-venulare,
- componente perivascolare.

La componente arteriosa corrisponde alla porzione terminale di un ramo arterioso periferico di piccolo calibro e presenta una parete di spessore estremamente sottile (unicamente un sottile monostrato di cellule endoteliali). I pochi elementi miocellulari che si trovano costituiscono gli sfinteri precapillari [2-7]. La seconda componente, la capillare, è rappresentata da microvasi maggiormente coinvolti negli scambi trofico-metabolici fra sangue e tessuti. Di questa componente, prima Bennet nel '59 e, successivamente, Rodhin nel '73, hanno

Classificazione secondo le caratteristiche della membrana basale	
Tipo A	Membrana basale continua
Tipo B	Membrana basale discontinua
Classificazione secondo le caratteristiche dell'endotelio	
Tipo 1	Con endotelio continuo e spesso
Tipo 2	Con endotelio continuo e sottile
Tipo 3	Con endotelio fenestrato
Tipo 4	Con endotelio discontinuo
Classificazione secondo i rapporti con i tessuti pericapillari	
Tipo α	Tessuti pericapillari evidenti
Tipo β	Tessuti pericapillari distaccati

Tabella 2. Classificazione dei capillari di Bennet e Rodhin

proposto una classificazione secondo le caratteristiche della membrana basale, dell'endotelio, e dei rapporti contratti con i tessuti pericapillari (v. tab.2).

Dapprima sembrava che la funzione dei vasi di scambio fosse svolta dai capillari in modo completamente passivo, ovvero che fosse regolata unicamente dalla differenza fra pressione idrostatica ed oncotica intra- ed extravasale; oggi è stato dimostrato che, invece, la parete dei capillari può modulare la propria permeabilità passiva in risposta alle sollecitazioni [8-10-31-40-47].

Ciascun capillare, malgrado non presenti miociti parietali, non si comporta in modo rigido e statico, ma modifica il proprio calibro in funzione di un'intrinseca motilità. Quest'ultima è giustificata dal probabile passaggio dallo stato di gel allo stato di sol, e viceversa, di mucopolissacaridi contenuti nello spazio endocapillare.

Nella componente venosa si distinguono due tipi di venule: le post-capillari e le collettrici; le prime differiscono poco dalla struttura dei capillari sebbene l'aumentato numero dei fibroblasti rappresenti una riserva per la funzione capillare, cui l'organismo ricorre in caso di aumentata necessità di scambi trofici tra sangue e tessuti. Le seconde hanno un diametro progressivamente crescente e una parete sempre più ricca di cellule muscolari lisce [19-31].

In base alle caratteristiche di organizzazione strutturale è possibile distinguere due tipi di anastomosi artero-venosa: un Tipo I costituito da connessioni dirette (*shunts* preterminali) ed un Tipo II più complicato per la presenza di un ulteriore segmento interposto fra quello arterioso e quello venoso. Questo segmento ospita particolari cellule dal citoplasma chiaro, responsabili della modulazione del

calibro del segmento intermedio [31-40-56], a causa della modificazione del proprio volume.

La componente perivascolare, costituita dai mastociti, prende legami con il sistema peri-linfatico tramite capillari linfatici; questa anastomosi è importante nel regolare gli scambi fra sangue e tessuti e nell'assicurare una funzione di drenaggio. Contrariamente a quanto a lungo ritenuto, il microcircolo non presenta una monotona, ripetitiva organizzazione strutturale ma, al contrario, una marcata variabilità inter-individuale e intra-individuale. Attraverso la capillaroscopia è stato ampiamente documentato come le diverse regioni cutanee o mucose differiscano fra loro per posizione, forma, calibro e microangiotettonica (organizzazione microcircolatoria) [56-47]. Questa peculiare disposizione dei capillari è strettamente dipendente non solo dal distretto anatomico ma è correlato anche all'età, al sesso, alle patologie in atto, a fattori ambientali con esposizione cronica [46-48].

PARAMETRI MORFOLOGICI (O STATICI)

La capillaroscopia orale trova indicazione in tutte le malattie la cui patogenesi riconosce un'anomalia anatomica e/o funzionale del microcircolo, il quale può presentare alterazioni sia di ordine quantitativo che qualitativo. Da un confronto con le metodiche diagnostiche istologiche, oggi considerate il *gold standard*, sono emersi numerosi vantaggi di tale tecnica, individuabili nell'assenza di invasività, nella sua notevole sensibilità, nella facilità e rapidità d'esecuzione, nel relativo basso costo e nel possibile valore predittivo

di una patologia. I limiti si possono rintracciare nella sua scarsa specificità, nell'estrema variabilità del pattern cosiddetto normale, nella possibile insufficiente visibilità dei capillari e infine nella difficoltà di prescindere dall'esperienza e dalla personale interpretazione di ciascun singolo operatore [9-14-29-48]. Le indagini sperimentali fino ad oggi sono state condotte preferibilmente sulla mucosa del labbro inferiore e su quella masticatoria del secondo e del quinto sestante. Difficilmente l'esame capillaroscopico è applicabile in altre zone del cavo orale dove le alterazioni da microtraumi lo rendono poco affidabile. I capillari si rendono visibili come anse comprese nelle papille dermiche. Nel soggetto con un quadro normale le anse sono regolarmente allineate, hanno una conformazione prevalente a U rovesciata e un calibro relativamente regolare, senza dilatazioni grossolane; inoltre occupano con densità omogenea il campo osservato [48].

La morfologia delle anse, il numero e il calibro dei vasi, il colore di fondo, la visualizzazione del sistema venoso, di microemorragie o di aggregati intravascolari permettono di fare diagnosi e di avere un maggior numero di informazioni sulla condizione del microcircolo in arteriopatie funzionali, come il diabete e, in modo meno specifico, nell'aterosclerosi. L'uso della capillaroscopia ha però una sua precisa elettività nel permettere di porre diagnosi precoce di patologie quali la Sclerodermia in presenza di un'arteriopatia funzionale preesistente [32-33]. Da notare è che una distrofia aneurismatica delle estremità distali delle anse capillari, megacapillari, stasi, emorragie, aggregati o mostruosità con megacapillari, fino ad un'atrofia cutanea ischemica con riduzione dei capillari, sono possibili quadri riscontrabili nei vari stadi di una sclerodermia. La valutazione di questi parametri

morfologici, permessa da apparecchiature sofisticate insieme all'utilizzo di software di ultima generazione, è molto complessa e richiede pertanto, come già detto, un'analisi attenta ed un operatore esperto. Proprio per questo motivo è necessario saper valutare avvalendosi di alcuni parametri oggettivi che distinguiamo in morfologici (o statici) e funzionali (o dinamici).

Tra i parametri morfologici più importanti distinguiamo:

- visibilità,
- morfologia delle anse,
- orientamento delle anse,
- densità capillare,
- lunghezza delle anse,
- diametro delle anse.

La visibilità può essere definita come la difficoltà di messa a fuoco dei capillari; ma questa può anche essere condizionata da altri fattori. Difatti gravi forme di ipercheratosi presenti nel sito dove si sta conducendo l'esame capillaroscopico comprometterebbero la trasparenza mucosa [14]. Per ciò che riguarda la morfologia delle anse dobbiamo ricordare che, essendo molto sottili, le pareti dei capillari possono presentare o no soluzioni di continuo. Come già accennato, la conformazione più usuale è quella a 'forcina di capelli' o a U rovesciata e si riscontra più facilmente a livello cutaneo, in zona periungueale, a livello mucoso, nel labbro inferiore. In altri distretti la morfologia può esprimersi con dei punti (detti anche capocchie di spillo), espressione del decorso perpendicolare rispetto alla cute o alla mucosa. La morfologia può anche cambiare in dipendenza dell'età del soggetto esaminato. In un soggetto anziano i capillari diventano più

tortuosi ed esili, con aumento significativo della lunghezza e del diametro delle singole anse.

Esistono e sono state ampiamente documentate diverse alterazioni morfologiche dei capillari dovute alla presenza di ectasie o per dilatazione a carico della branca afferente o efferente [9-50]:

- ✓ anse a forcina
- ✓ anse tortuose
- ✓ anse ramificate a corna di cervo
- ✓ anse arborescenti
- ✓ anse a cactus
- ✓ ectasie circoscritte
- ✓ slargamenti delle anse capillari
- ✓ megacapillari o anse giganti
- ✓ sfasamenti delle anse capillari
- ✓ emorragie perivasali apicali

Le anse possono presentare un orientamento diverso rispetto alla superficie cutanea o mucosa a seconda del distretto esaminato. I reciproci rapporti tra le singole anse e l'eventuale omogeneità del relativo orientamento condizionano una distribuzione che, nel suo complesso, si presenta ordinata e regolare in condizioni normali, alquanto disordinata in corso di patologia.

La densità capillare è ovviamente determinata dal numero di anse presenti per unità di superficie; si pensi che in un mm^2 troviamo presenti dalle 12 alle 16 anse [49].

Uno dei parametri più difficili da definire è la lunghezza delle anse, poiché ampiamente condizionata dalla proiezione del vaso sulla superficie mucosa: più il decorso è parallelo rispetto ai piani di

superficie, più il capillare appare lungo e viceversa. In ogni caso il range di normalità della lunghezza di un capillare oscilla fra un minimo di 150 μ m e un massimo di 500 μ m (per i capillari ad andamento rettilineo).

In ultimo troviamo il diametro delle anse, globalmente compreso fra 4 e i 14 μ m con differenze fra branca arteriolare, più sottile, a quella venulare, più spessa. La prima avrebbe un diametro di circa 8 μ m, la seconda di 10-12 μ m, il tratto intermedio, o ansa propriamente detta di 8-14 μ m. Per la difficoltà di andare a rilevare queste così piccole dimensioni si può utilizzare un tracciante che è la fluorescina, la quale consente di rendere luminescente il lume capillare; in questo caso si misurano diametri maggiorati di circa 4 μ m in più rispetto i valori sopra riportati (capillaroscopia a fluorescenza).

Sfruttando le proprietà della fluorescina, Bollinger ha dimostrato l'esistenza di alterazioni della barriera endoteliale ed ha introdotto l'uso del verde di indocianina, con il quale è addirittura possibile misurare il diametro della colonna eritrocitaria. In pratica, mediante queste tecniche a fluorescenza, si possono valutare soprattutto i parametri statici e quindi l'integrità funzionale di un intero tessuto [3-48].

III

MATERIALI E METODI

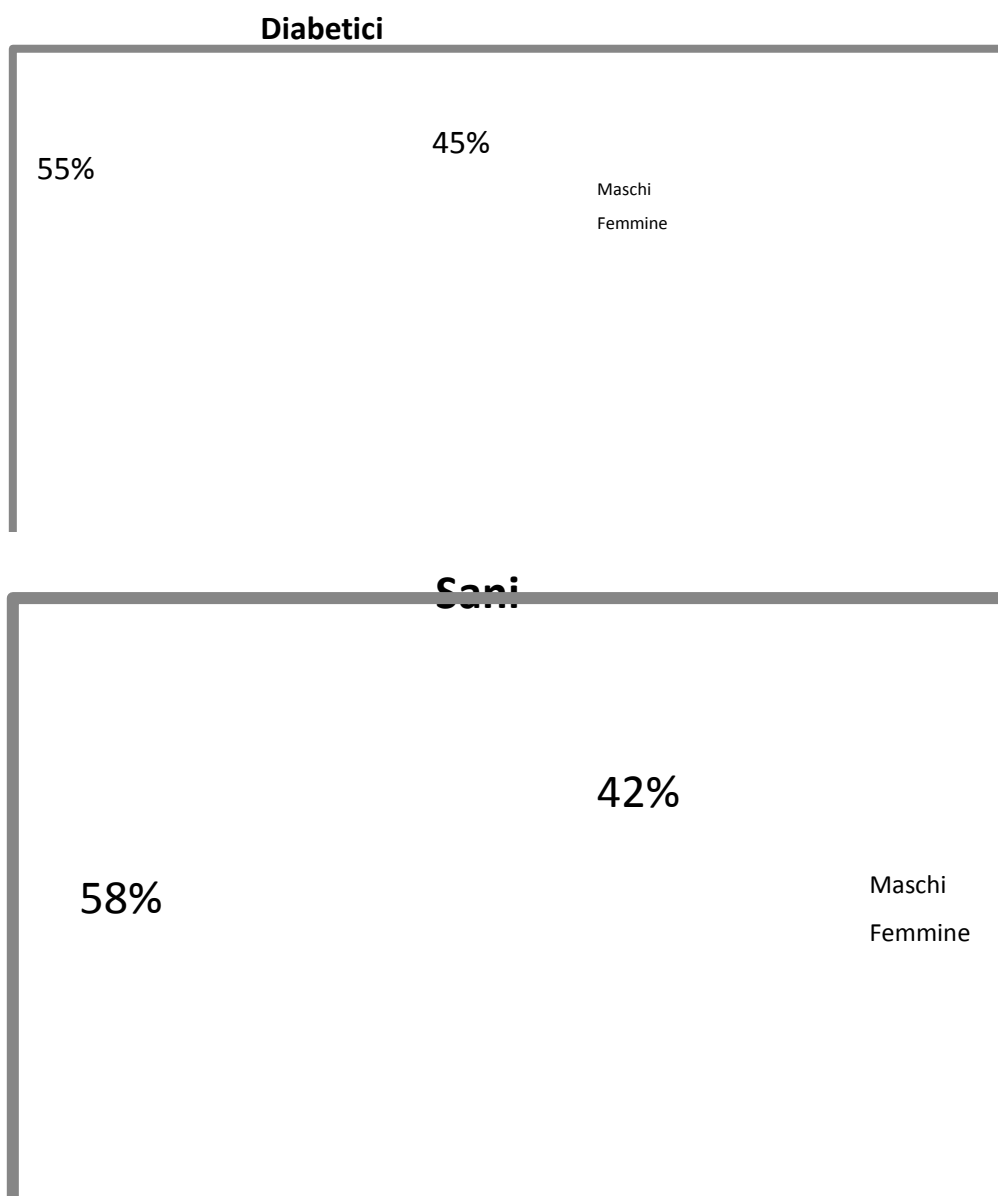
Il presente studio si è svolto presso il reparto di Odontostomatologia del Dipartimento di Discipline Chirurgiche ed Oncologiche - Sezione di Scienze Stomatologiche “G.Messina” - Policlinico “P. Giaccone” - Università degli Studi di Palermo sotto la supervisione del Tutor e relatore Prof. Pietro Messina e del co-relatore Prof. Giuseppe Alessandro Scardina.

Sono stati arruolati 80 soggetti divisi in due gruppi: 40 pazienti costituenti il ‘gruppo casi’ (a cui ci riferiremo come gruppo A) con una diagnosi di Diabete Mellito di tipo II (18 maschi e 22 femmine di età compresa tra 44 e 85 anni); 40 soggetti sani (17 maschi e 23 donne di età compresa tra 44 e 78 anni), a cui ci riferiremo come gruppo B⁷ (v. tab.3).

⁷ La differenza di età tra il gruppo A e il gruppo B è stata valutata statisticamente con il Mann-Whitney test, ed è risultata non-significativa ($p=0,932$). I due gruppi pertanto si ritengono del tutto omogenei e sovrapponibili in quanto a distribuzione anagrafica e rappresentanza dei due sessi.

Tabella 2. Caratteristiche anagrafiche dei pazienti arruolati nello studio

	Gruppo B (Soggetti sani)	Gruppo A (Pazienti Diabetici)
Età (media±ds)	64,51±11,32	63,82±11,13
Range Età	44-78	44-85
M/F ratio	17/23	18/22



Grafici 1 e 2. Rappresentazioni grafiche con diagramma a “torta” dei rapporti M/F nel gruppo A, pazienti diabetici, e nel gruppo B, soggetti sani.

Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso all'esecuzione dell'esame capillaroscopico ed all'archiviazione ed utilizzo per scopi scientifici dei dati ottenuti, in osservanza delle normative italiane in materia di privacy e di trattamento dei dati personali (Legge 675/1996, art. 1-29).

I pazienti del gruppo A sono stati selezionati in base ai seguenti criteri:

- Pregressa diagnosi di Diabete Mellito di tipo II;
- Sottoposizione a terapia ipoglicemizzante per via orale da almeno un anno con controllo routinario del livello di glicemia
- Assenza di altre condizioni patologiche che potessero causare alterazioni del microcircolo periferico della mucosa orale quali ipertensione, artrite reumatoide, sindrome di Sjogren, lichen planus orale, pemfigo, pemfigoide, sclerodermia, tiroidite di Hashimoto
- Assenza di esposizione a fattori di rischio quali fumo di sigaretta e l'alcool
- Assenza di esposizione ad agenti radio- e chemio-terapici

Tutti i pazienti del gruppo A sono stati sottoposti a visita odontostomatologica di controllo. Per ogni paziente è stato effettuato un esame obiettivo completo dei tessuti molli e tessuti duri del cavo orale. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con lesioni rosse o bianche del cavo orale. Per ogni paziente è stato effettuato un controllo dello stato parodontale. I pazienti con evidenti segni clinici

di malattia parodontale sono stati esclusi dallo studio. I pazienti con scarsa igiene orale sono stati preventivamente sottoposti a sedute di igiene professionale. Lo stato di igiene orale è stato scrupolosamente ricontrollato prima dell'esame capillaroscopico.

I soggetti del gruppo B sono stati selezionati in base ai seguenti criteri:

- Assenza di condizioni patologiche sistemiche o topiche, correlabili ad alterazione del microcircolo del cavo orale
- Assenza di malattia parodontale in atto
- Assenza di esposizione a fattori di rischio quali il fumo di sigaretta e l'alcool
- Assenza di esposizione ad agenti radio- e chemio-terapici

Tutti i pazienti dei gruppi A e B sono stati sottoposti ad esame videocapillaroscopico della mucosa del cavo orale. L'esame è stato condotto per mezzo del videocapillaroscopio Videocap 200 prodotto dalla DS Medica S.r.l., Milano, Italia.

Il videocapillaroscopio utilizzato per questo studio è così costituito:

- un corpo centrale comprendente una sorgente luminosa a luce alogena fredda emessa da una lampada di 100W dotata di possibilità di controllo manuale della luminosità e del bilanciamento del bianco
- una sonda con terminale ottico congiunta al corpo centrale da un cavo a fibre ottiche flessibile della lunghezza di 2 metri; il terminale ottico è costituito a sua volta da una microtelecamera a colori ad alta risoluzione (420.000 pixels), un supporto per l'alloggiamento dei differenti obiettivi, una ghiera per la regolazione fine della messa a fuoco, una ghiera radiale in punta

con illuminazione anulare (per un'illuminazione uniforme e priva di ombre). Le ottiche applicabili possono essere del tipo a contatto o non a contatto con ingrandimenti variabili: 20x, 50x, 100x, 200x, 500x, 1000x

- un personal computer con scheda di acquisizione video dedicata e collegata al corpo centrale del videocapillaroscopio mediante cavo S-video. Sul PC è installato il software di imaging capillaroscopico il *VideoCap Software release 8.0*
- un monitor a colori ad alta risoluzione a tubo catodico

L'esame capillaroscopico è stato condotto in condizioni di temperatura e d'illuminazione standardizzate:

- temperatura dei locali di $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ mantenuta costante con sistemi di condizionamento del clima

- illuminazione a mezzo di luce Neon per uso medicale con punto del bianco pari a 6500°K

Per ogni soggetto esaminato è stata effettuata una mappatura capillaroscopica completa del cavo orale. In ordine le sedi indagate sono state le seguenti:

- mucosa labiale inferiore

- mucosa labiale superiore

- mucosa geniena retrocommesurale (destra e sinistra)

- mucosa masticatoria/gengivale vestibolare del III e del V sestante

- mucosa di rivestimento sottolinguale

Per ogni sede sono state catturate un numero minimo di cinque immagini. Tutte le acquisizioni sono state condotte in orario antimeridiano con i soggetti in posizione seduta.

L'ottica scelta è stata quella con ingrandimento costante di 200x e messa a fuoco variabile⁸ (da 0 a 2mm). Tale ottica è stata selezionata tra le varie disponibili per le buone doti di resa di immagine in quanto a dettaglio offerto (buona lettura del letto capillare) ed ampiezza dell'area esaminata (1.818mm²).

Tutte le acquisizioni e le successive elaborazioni delle immagini capillaroscopiche sono state condotte dallo stesso operatore, il dottorando A. Cacioppo.

Riferendoci alla classificazione dei quadri capillaroscopici e della microangiotettonica del microcircolo secondo il Curri [7-8-9], i quadri videocapillaroscopici esaminati sono del tipo I (disposizione delle anse capillari⁹ parallele alla superficie mucosale, tipica del microcircolo della mucosa labiale) e del tipo II (disposizione delle anse capillari perpendicolare alla superficie mucosale, tipica del microcircolo della mucosa masticatoria).

I parametri capillaroscopici valutati sono i seguenti (v. sch..1):

1. densità delle anse capillari (DC), definita come il numero di anse per unità di superficie; questo parametro, come emerso da precedenti studi capillaroscopici sulla mucosa orale, è quello più direttamente correlato allo stato infiammatorio dei tessuti ed all'attività angiogenetica; di particolare importanza è la misurazione della densità a livello della mucosa parodontale per una valutazione dello stato di flogosi del parodonto superficiale

⁸ L'ottica 200x ha in realtà lunghezza focale fissa. La sua capacità di variare il piano di messa a fuoco dipende dalla capacità di essere avvicinata o allontanata dalla superficie mucosale con movimenti micrometrici, per mezzo della ghiera rotante presente sul dorso della sonda ottica.

⁹ Ansa capillare: si definisce ansa capillare l'entità del microcircolo terminale periferico che parte dal plesso papillare orizzontale della mucosa orale e che è composta da un braccio ascendente o afferente, da un'ansa intrapapillare propriamente detta o gomito dell'ansa e da un braccio discendente o efferente.

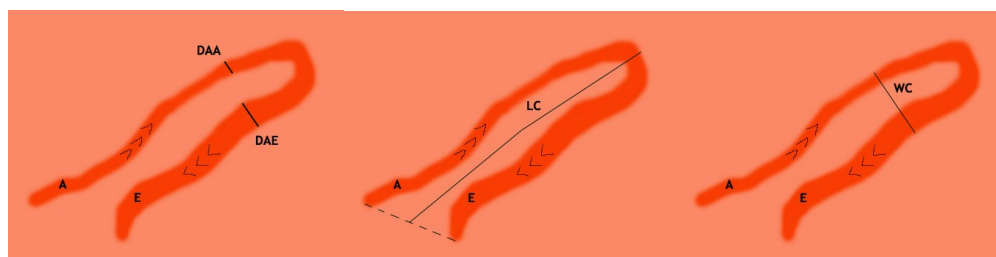
2. massima larghezza dell'ansa capillare (WC), definita come la distanza tra le tangenti all'ansa capillare, parallele all'asse lungo dell'ansa stessa, nei punti di massima convessità

3. lunghezza totale dell'ansa capillare (LC), definita come la distanza tra la nascita dell'ansa, il congiungimento tra punto iniziale del capo afferente e punto finale del capo efferente, e la sommità dell'ansa stessa

4. diametro ansa efferente (DAE), il massimo calibro del capo efferente¹⁰ o venoso dell'ansa capillare

5. diametro ansa afferente (DAA), il massimo calibro del capo afferente o arterioso dell'ansa capillare

È stata valutato anche il grado di tortuosità, attribuendo uno score da 0 a 3 in base al numero di incroci tra capo afferente e capo efferente dell'ansa capillare: score 0, nessun incrocio; score 1, singolo incrocio; score 2, più di due incroci; score 3, anse totalmente distorte.



Schema 1- Rappresentazione schematica dei parametri morfologici misurati: DAA e DAE, LC, WC.

¹⁰ Ansa afferente ed ansa efferente in una indagine capillaroscopica statica che non contempli valutazioni emodinamiche, si distinguono in base al loro calibro: il capo afferente presenta sempre un diametro massimo inferiore a quello del capo efferente. Queste caratteristiche morfologiche dei due capi dell'ansa giustificano, per il principio di Bernoulli, il rallentamento del flusso sanguigno nell'estremità dell'ansa, alla base degli scambi metabolici con i tessuti.

IV

RISULTATI

Sono stati esaminati, in totale, oltre duemila quadri capillaroscopici (5 sedi d'indagine per ognuno degli 80 pazienti ed un minimo di 5 immagini catturate per ogni sede indagata) e per ogni quadro o immagine capillaroscopica sono state effettuate un minimo di 5 misurazioni, per un totale di oltre diecimila misurazioni effettuate.

Tutte le misure lineari, espresse in mm (millimetri), sono state raggruppate per ogni soggetto e per ogni sede indagata. Per le misure lineari è stata prediletta la mucosa labiale, quella che ha dato i migliori risultati in termini di visibilità del microcircolo. Ad ogni parametro misurato (WC, LC, DAE, DAA) è stato attribuito un valore, per singolo paziente, pari alla media di tutte le misure relative al parametro stesso. Questi valori (medie±deviazioni standard) sono riportati in tabella 4.

	Lunghezza totale (LC)	Diametro totale (WC)	Diametro afferente (DAA)	Diametro efferente (DAE)
Pazienti diabetici (media±ds)	0,248±0,066	0,038±0,006	0,009±0,002	0,016±0,0059
Soggetti sani (media±ds)	0,192±0,054	0,0324±0,008	0,009±0,002	0,0157±0,007

Tabella 4. Medie e deviazioni standard relative alle misurazione dei parametri LC, WC, DAA, DAE effettuate sui pazienti diabetici e sui soggetti sani. Tutti i valori sono riferiti alla mucosa labiale. Tutti i valori sono espressi in mm.

Le misurazioni inerenti la densità (espressa in numero di anse/mm²) delle anse capillari terminali sono state condotte sulla mucosa labiale (DC-L, densità capillare labiale) e masticatoria (DC-P, densità capillare parodontale). I risultati ottenuti sono divergenti e sono riportati in tabella 5.

	Densità labiale (DC-L)	Densità parodontale (DC-P)
Pazienti diabetici (media±ds)	16,01±3,74	35,62±10,40
Soggetti sani (media±ds)	21,13±2,75	17,55±3,88

Tabella 5. Medie e deviazioni standard della densità delle anse capillari su mucosa labiale e mucosa masticatoria nei pazienti diabetici e nei soggetti sani. Tutti i valori sono espressi in n°anse/mm².

ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati raggruppati e sottoposti ad analisi statistica per verificare la significatività delle differenze tra pazienti diabetici e soggetti sani. Il test scelto è il Mann-Whitney, test di comparazione statistica per dati ordinali non parametrici¹¹. Il Mann-

¹¹ Si dicono non-parametrici (o indipendenti dalle distribuzioni) i test che non necessitano di particolari condizioni per essere applicati: non è necessario che il campione contenga più di un certo numero di elementi; non è necessario che le grandezze confrontate seguano una certa distribuzione; non hanno come scopo la stima dei parametri della popolazione sulla base delle caratteristiche del campione. Secondo molti studiosi di statistica, il ricorso ai test non parametrici è richiesto solamente quando non è possibile utilizzare i corrispondenti test parametrici, nemmeno dopo la trasformazione dei dati. Tale impostazione classica, nella pratica corrente degli ultimi anni, appare superata da quella che ora è definita “statistica moderna”. In particolare per la statistica univariata o bivariata, nelle discipline caratterizzate da una grande variabilità dei dati e dall’uso di campioni piccoli, come in gran parte degli esperimenti a carattere biologico e medico, i test parametrici progressivamente sostituiscono quelli parametrici o almeno li affiancano.

Whitney test è stato scelto perché, come evidenziato dalla larga diffusione negli studi sperimentali in campo medico, risulta uno dei test di comparazione statistica più efficaci con una precisione del 95% anche su indagini riguardanti campioni numerosi. Il livello di significatività scelto è stato di $p < 0,05$. Le differenze tra i gruppi con valore di p inferiore a 0,05 sono state considerate statisticamente significative.

Ci si è avvalsi, per tutte le misurazioni e le analisi statistiche dell'ausilio informatico del software P.A.S.T., un *freeware* sviluppato da Øyvind Hammer, D.A.T. Harper e P.D. Ryan nel 1995 e aggiornato all'ultima versione, *release* 1.97, nel Gennaio 2010.

I risultati dell'analisi statistica sono stati raggruppati e sono riportati nella tabella 6.

	DC-L (n°/mm²)	DC-P (n°/mm²)	LC (mm)	WC (mm)	DAA (mm)	DAE (mm)
Gruppo A (media±ds)	16,01±3,74	35,62±10,40	0,248±0,066	0,038±0,006	0,009±0,002	0,016±0,0059
Gruppo B (media±ds)	21,13±2,75	17,55±3,88	0,192±0,054	0,0324±0,008	0,009±0,002	0,0157±0,007
Significance (p<0,05)	S	S	S	S	NS	NS
P	0,0000256	0,000000986	0,006	0,0103	0,74	0,64

Tabella 6. Tabella riassuntiva delle differenze tra pazienti diabetici e soggetti sani relativamente ai parametri misurati. In tabella i risultati dell'analisi statistica condotta con il Mann-Whitney test con livello di significatività $p < 0,05$.

L'analisi statistica dei dati raccolti ha evidenziato delle variazioni altamente significative riguardanti la densità capillare (sia a livello della mucosa labiale che di quella masticatoria), la lunghezza delle anse e il diametro totale delle anse.

La densità capillare media, a livello della mucosa labiale, risulta diminuita nei pazienti diabetici ($16,01 \pm 3,74$ n°anse/mm²) rispetto ai soggetti sani ($21,13 \pm 2,75$ n°anse/mm²). Tale differenza ha dato, al Mann-Whitney test, un valore di $P=0,0000256$ che indica una differenza altamente significativa dato che risulta ampiamente al di sotto della soglia di significatività.

La densità capillare media parodontale (DC-P), risulta nettamente superiore nei pazienti diabetici ($35,62 \pm 10,40$ n°anse/mm²) rispetto ai soggetti sani ($17,55 \pm 3,88$ n°anse/mm²). Il valore di P, nettamente al di sotto del livello di significatività ($p= 0,000000986$), evidenzia un'alta significatività del risultato ottenuto.

La lunghezza totale media delle anse capillari (LC) risulta significativamente aumentata nei pazienti diabetici ($0,248 \pm 0,066$ mm) rispetto ai soggetti sani ($0,192 \pm 0,054$ mm), con un valore di $P=0,006$ al Mann-Whitney test.

Il diametro massimo medio (WC) delle anse capillari si dimostra significativamente aumentato nei pazienti diabetici ($0,038 \pm 0,006$ mm) rispetto ai soggetti sani ($0,0324 \pm 0,008$ mm), con un valore di $P=0,0103$.

Né il calibro medio dell'ansa afferente (DDA) né quello dell'ansa efferente (DDE), risultano alterati in modo significativo nei pazienti diabetici, ma, al contrario, appaiono del tutto sovrapponibili a quelli dei pazienti sani.

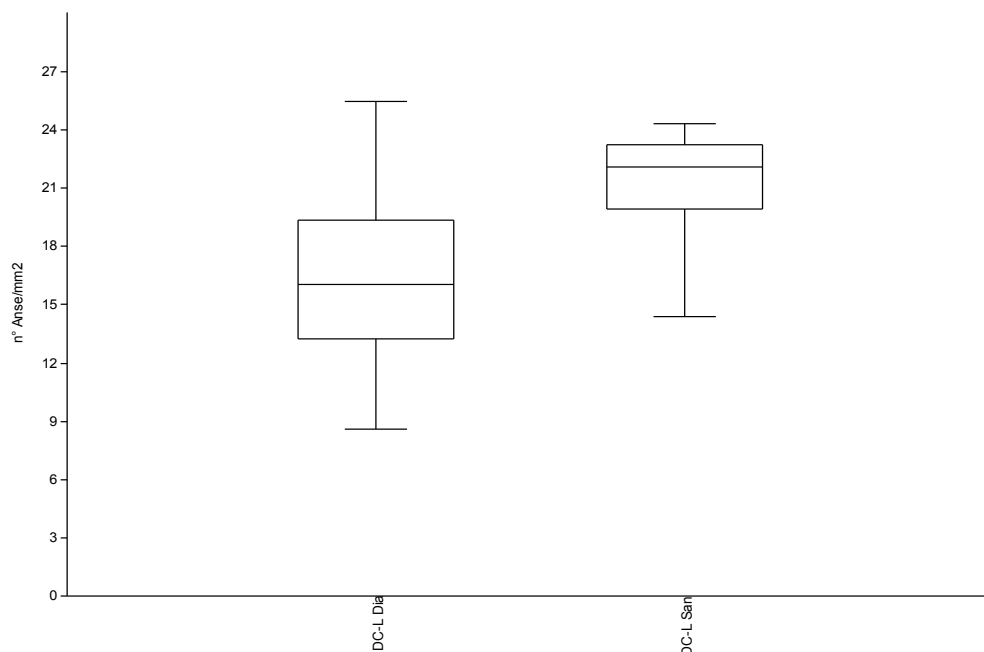


Grafico 3. Box plot della densità dei capillari misurata sulla mucosa labiale (DC-L) su pazienti diabetici, a sinistra, e soggetti sani, a destra. La rappresentazione grafica evidenzia una significativa diminuzione della densità capillare a livello labiale nel paziente diabetico rispetto al soggetto sano, indice di un ridotto trofismo ematico periferico.

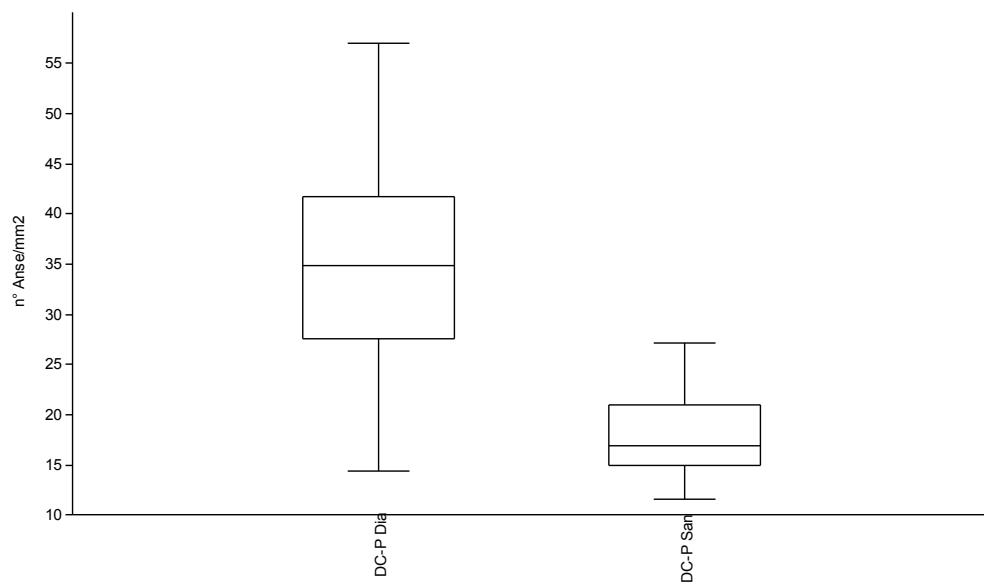


Grafico 4. Box plot della densità dei capillari misurata a livello della mucosa masticatoria/gengivale su pazienti diabetici, a sinistra, e soggetti sani, a destra. I box plot evidenziano un aumento altamente significativo della densità capillare nel paziente diabetico rispetto al soggetto sano, indice di stato flogistico/infiammatorio a livello parodontale.

La tortuosità media delle anse capillari nei pazienti diabetici è risultata aumentata rispetto ai soggetti sani con uno score medio di 2,4. L'aumento di tortuosità tra soggetti sani e pazienti diabetici è risultato altamente significativo.

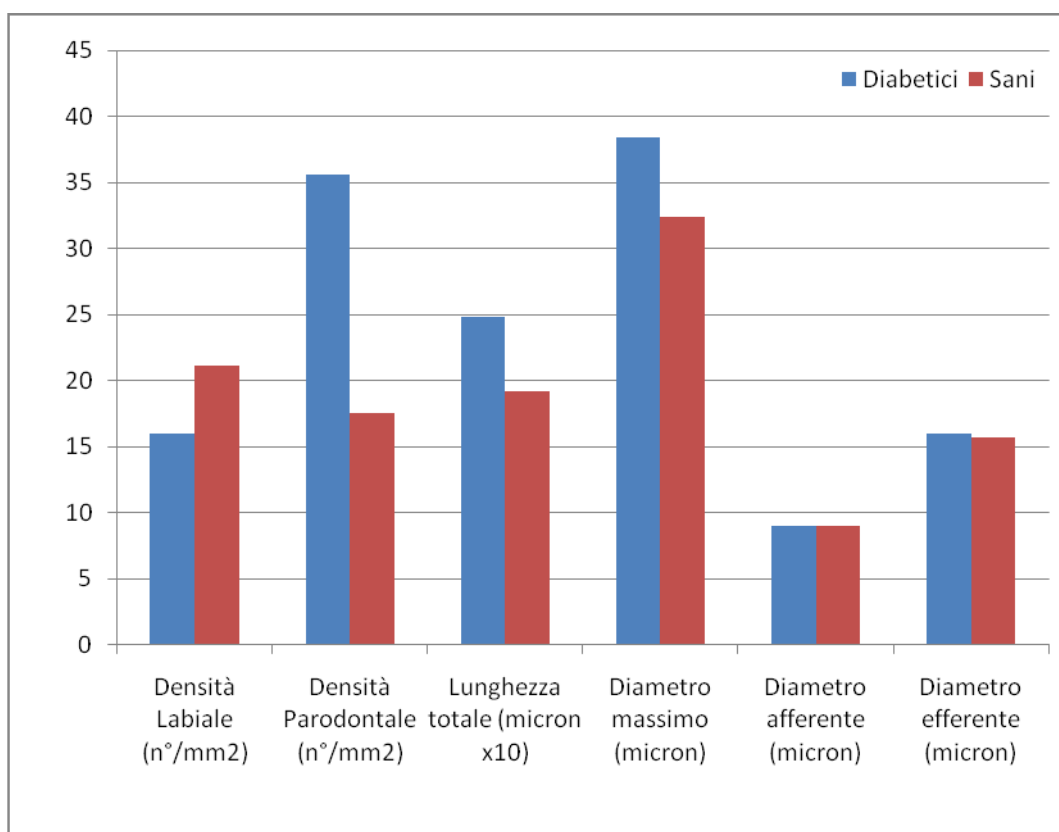


Grafico 5. Istogramma dei valori misurati, per i parametri presi in considerazione, sui soggetti sani e sui pazienti diabetici.

V

DISCUSSIONE

Il diabete mellito ha effetti importanti sul macrocircolo e sul microcircolo periferico, come testimoniato dalle frequenti patologie cardiovascolari e dalla microangiopatia diabetica con le sue ripercussioni organo-specifiche e distrettuali. La disfunzione del microcircolo riguarda le arteriole e i capillari della retina e dei reni, i *vasa nervorum* e i *vasa vasorum*. Porta a conseguenze spesso irreversibili quali la cecità, la disfunzione renale con necessità di dialisi o di trapianto d'organo quando bilaterale, la neuropatia periferica con alterazioni della sensibilità e infine la vasculopatia periferica con danni da alterato trofismo quali il cosiddetto piede diabetico. Correlata in parte alla glicazione delle proteine e in parte all'alterazione dei *vasa-vasorum*, la disfunzione del macrocircolo esita in patologie cardiache quando è coinvolto il sistema coronarico, come nel caso di infarto miocardico o insufficienza arteriosa periferica. Il danno a carico delle estremità distali degli arti può essere talmente importante da rendersi necessaria talvolta anche l'amputazione dell'arto.

A livello microscopico il danno diabetico si estrinseca a carico delle cellule endoteliali che costituiscono il rivestimento dei piccoli e dei grossi vasi. Si riscontrano effetti secondari sulla permeabilità

vascolare (che si traduce in un alterato trofismo tissutale), sul metabolismo delle lipoproteine con formazione di complessi proteici glicosilati, nonché sulla membrana basale e sui processi coagulativi. La principale funzione dell'endotelio vasale è l'omeostasi attraverso la sintesi ed il rilascio di una grande varietà di molecole ad attività pro-coagulante, vasocostrittiva e vasodilatatoria. Tra queste si annoverano i fattori della coagulazione, la prostaciclina, l'endotelina, le prostaglandine e l'ossido nitrico (NO). L'insieme di queste sostanze contribuisce a modulare il tono vascolare, la permeabilità, la coagulazione e, in senso più ampio, i processi riparativi dei piccoli vasi. Un endotelio intatto e perfettamente funzionante costituisce una protezione contro lo sviluppo di placche ateromatose e costituisce la base per la salute dei tessuti. Questa barriera protettiva viene rafforzata dal mantenimento di una superficie vasale liscia e omogenea che previene la trombogenesi, l'adesione di monociti, macrofagi e piastrine ed il trasporto di lipoproteine attraverso il *cell-wall*. In presenza di iperglicemia questa barriera è distrutta e i meccanismi reattivi divengono disfunzionali, esitando in complicanze micro e macrovascolari. La disfunzione dell'endotelio vasale si riflette anche a livello capillaroscopico, come emerge dai risultati ottenuti.

Il diabete mellito è una patologia cronica che causa una progressiva sofferenza della microcircolazione periferica, esplicitata in alterazioni dei pattern vascolari, come ampiamente dimostrato da precedenti studi sulla capillaroscopia congiuntivale e peri-ungueale e sull'ispezione del fondo oculare. La diminuzione della densità capillare, evidenziata a livello della mucosa labiale, è un probabile sintomo della microangiopatia periferica tipica della malattia diabetica. La microangiopatia diabetica, così come in altri distretti

anatomici, induce anche a livello della mucosa orale una riduzione del trofismo periferico, oggetto di questo studio. Questa riduzione del microcircolo a livello orale si estrinseca in una riduzione del numero di anse per mm^2 . Tale povertà vascolare, insieme all'aumentata concentrazione salivare di glucosio, potrebbe giustificare, almeno in parte, la maggiore suscettibilità della mucosa orale alle sovra-infezioni da parte di patogeni opportunisti quali la *candida albicans*. Rimarchevole è che le candidiasi nei soggetti con Diabete mellito sono molto frequenti.

Contemporaneamente alla diminuzione della densità capillare si è registrato un aumento della lunghezza media delle anse e un aumento del diametro totale dell'ansa. Le anse capillari appaiono, nei pazienti diabetici, mediamente più lunghe e più larghe rispetto ai soggetti sani. I due capi, afferente ed efferente, si allontanano l'uno dall'altro e il vertice dell'ansa tende ad allargarsi fino ad assumere una conformazione piatta (v. fig. 8) o addirittura, come spesso si è evidenziato, a corna di cervo (v. fig. 1-2). L'aumento della superficie di scambio metabolico tra circolo e tessuti si può interpretare come un tentativo di sopperire al ridotto trofismo della mucosa, legato alla diminuzione della densità capillare. Il risultato di questo tentativo di compenso sarebbe un allungamento delle anse capillari, rese più tortuose e con una testa più ampia. Questa risulta essere la porzione del capillare maggiormente deputata agli scambi metabolici, grazie all'epitelio di rivestimento sottile e fenestrato.

In ultima analisi la lunghezza complessiva dell'ansa, intesa questa volta come l'insieme dei punti che costituiscono il capillare terminale da quando questo si rende visibile a quando si affonda nuovamente nel connettivo sottostante, risulta decisamente aumentata

nel paziente diabetico, con un conseguente incremento della superficie di scambio con i tessuti. L'endotelio vasale quindi prolifera non generando una gemmazione con fenomeni angiogenetici del capillare propriamente detto ma dando luogo ad un aumento in lunghezza del capillare. Questo, non potendo estendersi in superficie più di quanto gli sia consentito dalla densità del connettivo sottoepiteliale e dal vicino strato basale dell'epitelio, verosimilmente tende a introflettersi creando dei veri e propri gomitoli o grovigli capillari. Questo fenomeno è manifestato dall'aumentata tortuosità media delle anse. In più, quando ancora il capillare non è totalmente distorto, i due capi dell'ansa capillare si allontanano come nel tentativo di aumentare il numero di cellule del connettivo interstiziale presenti tra loro.

Degno di nota è anche il rilievo che il calibro dei due capi dell'ansa non subisce alcuna variazione statisticamente significativa, contrariamente a quanto avviene nelle patologie infiammatorie croniche, quali il *Lichen Planus Orale*, l'Artrite Reumatoide, la sindrome di Sjogren. Non vi sono quindi i segni di una maggiore perfusione tissutale, legata ai fenomeni flogistici e modulata da molecole pro-infiammatorie, ma solo quelli di una maggiore superficie di scambio. Questo elemento caratteristico, emerso dalla disamina di circa duemila quadri capillaroscopici, potrebbe essere dirimente in una possibile diagnosi differenziale videocapillaroscopica tra il danno microcircolatorio imputabile al DM e quello imputabile piuttosto ad una concomitante patologia su base flogistica.

Per quanto concerne il letto vascolare del parodonto superficiale (mucosa masticatoria/gengivale) ciò che si evidenzia a livello capillaroscopico è in netto contrasto con quando emerso in sede

labiale. La densità dei vasi aumenta di circa il doppio nei pazienti diabetici rispetto ai soggetti sani.

Altra caratteristica del pattern capillare del paziente diabetico risulta una morfologia a ‘macchia di ghepardo’, con diffuse microemorragie e capillari a coccarda. I capillari che solitamente si evidenziano nelle immagini capillaroscopiche in sede di mucosa masticatoria come capocchie di spillo, appaiono più slargati, quasi a formare dei piccoli cerchi ravvicinati (v.fig. 3-5-6-15). L’aumento della densità capillare potrebbe suggerire la presenza di fenomeni flogistici in atto o, più verosimilmente, una tendenza alla maggiore suscettibilità a fenomeni infiammatori. Diversi autori hanno messo in evidenza una maggiore propensione alla malattia parodontale nei pazienti diabetici, rapportandola a segni ed indici subclinici più o meno evidenziabili (sanguinamento spontaneo o provocato, aumento di flusso del fluido sulculare, alterazione della composizione del fluido sulculare, etc). Non sono state evidenziate ed oggettivate fino ad oggi le caratteristiche, in vivo, del pattern microcircolatorio parodontale nel paziente diabetico, in assenza di diagnosi di malattia parodontale. Risulta evidente l’importanza della videocapillaroscopia applicata allo studio del parodonto superficiale per la diagnosi precoce ed il monitoraggio della malattia parodontale.

VI

CONCLUSIONI

Diversi studi sono stati effettuati negli ultimi anni per valutare in vivo le alterazioni morfologiche del letto capillare nei pazienti diabetici utilizzando la videocapillaroscopia, sintomo di una necessità da parte della comunità medica di poter ‘stadiare’ la malattia diabetica, monitorarla, e diagnosticare precocemente i danni ad essa correlati. Tale metodica è stata utilizzata, in passato, per indagare il letto congiuntivale e il letto ungueale ed in entrambe i casi è riuscita a mettere in evidenza alterazioni direttamente correlabili alla malattia diabetica.

Il distretto orale presenta, rispetto alla mucosa congiuntivale ed alla plica ungueale numerosi vantaggi in termini di accessibilità, non-invasività e visibilità. La mucosa del labbro inferiore, in particolar modo, presenta un’ottima accessibilità, una elevata visibilità del microcircolo e una scarsa invasività durante l’esame dovuta alla mancanza dello strato corneo e al ridotto spessore dell’epitelio. Considerati gli indubbi vantaggi, il labbro, in particolare quello inferiore, si candida a divenire la sede migliore per l’indagine capillaroscopica nei pazienti diabetici.

Negli ultimi anni la videocapillaroscopia orale è stata applicata con eccellenti risultati anche in pazienti con patologie infiammatorie

croniche e autoimmuni (*Lichen Planus Orale*, Artrite Reumatoide, Sclerodermia, Tiroidite di Hashimoto, etc) ed è stato ampiamente dimostrato il suo potenziale nella diagnosi e nel monitoraggio di tali patologie.

Dalla revisione della letteratura risulta che questo sia il primo studio videocapillaroscopico sulla mucosa orale atto ad investigare in vivo le alterazioni microcircolatorie nei pazienti diabetici.

In ultima analisi questo studio dimostra che ci sono dei danni periferici del microcircolo a livello della mucosa labiale e della mucosa masticatoria nei soggetti diabetici e che tali alterazioni sono oggettivabili e quantificabili strumentalmente, mediante la metodica videocapillaroscopica.

Un'istantanea della situazione microcircolatoria del paziente diabetico evidenzia le alterazioni a livello della mucosa labiale che permettono di oggettivare il danno periferico della microangiopatia diabetica. Le alterazioni a livello della mucosa parodontale permettono invece di stadiare, anche a livello subclinico, la malattia parodontale.

Si ritiene che i risultati di questa ricerca siano di estrema importanza nel settore odontostomatologico, purché medicina orale, clinica odontostomatologica e parodontologia continuino ad interagire. Tali risultati, estremamente incoraggianti, gettano di fatto le fondamenta per futuri studi atti a commisurare la quantità del danno parodontale e microcircolatorio con le caratteristiche morfologiche e densitometriche peculiari dei pattern capillaroscopici della mucosa orale.

Il sottoscritto dottorando di ricerca, dott. Antonino Cacioppo, ritiene che tutte le aspettative nei confronti di questa ricerca siano

state soddisfatte. La strada per arrivare a definire una nuova metodica di *screening* e di monitoraggio della patologia diabetica è certamente lunga e irta di ostacoli. Pur non di meno, il sottoscritto confida nella possibilità della videocapillaroscopia di assurgere al ruolo, in un prossimo futuro, di test d'elezione nella diagnosi sub-clinica e clinica delle patologie della mucosa orale e delle affezioni sistemiche che, direttamente o indirettamente, influenzano i tessuti molli del cavo orale, non ultimo il Diabete Mellito.

Il dottorando di ricerca,
dott. *Antonino Cacioppo*

APPENDICE FOTOGRAFICA/CAPILLAROSCOPICA

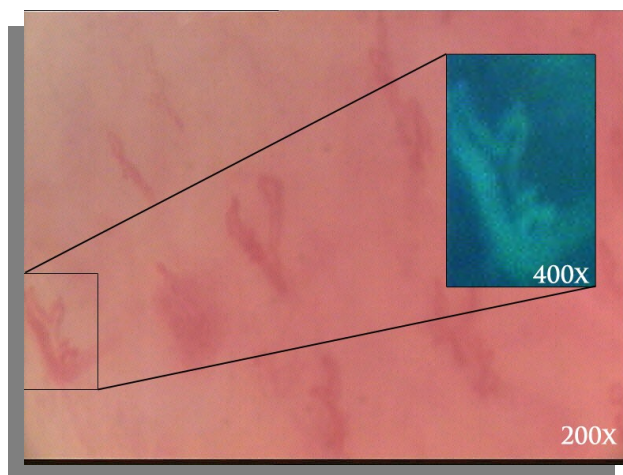


Figura 1. Pattern capillaroscopico di mucosa labiale su paziente diabetico. Ingrandimento 400X di un capillare con morfologia “a cactus”. Si notano poche anse capillari, particolarmente distorte e tortuose.

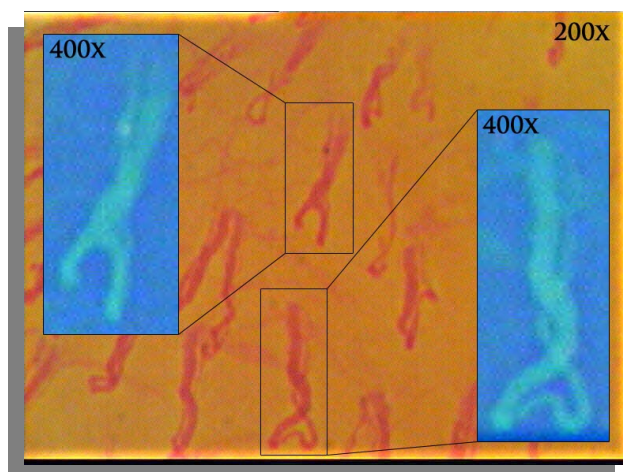


Figura 2. Pattern capillaroscopico di mucosa labiale su paziente diabetico. Ingrandimenti a 400x di capillari scon morfologia “a fionda” (a sinistra) e “a corna di cervo” (a destra). Le anse capillari appaiono allungate, distorte e con morfologie alterate.

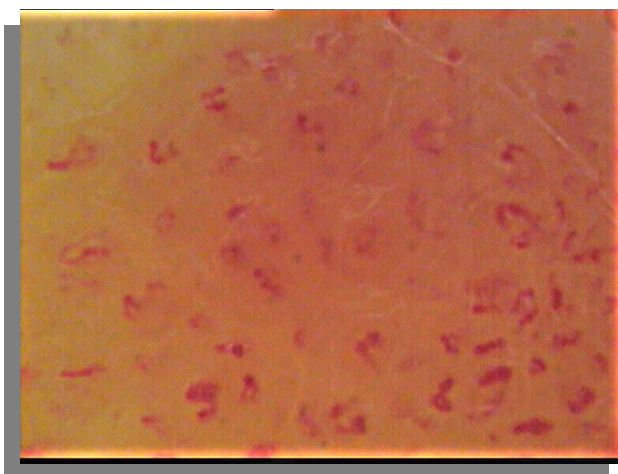


Figura 3. Pattern capillaroscopico di mucosa masticatoria vestibolare del II sestante su paziente diabetico (femmina di 57 anni). Si notano capillari non 'a capocchia di spillo' ma con morfologia maculiforme. L'aspetto dei capillari mima le macchie di una pelliccia di ghepardo. Il numero di anse risulta aumentato. Si notano anse ad 'otto'. Ingrandimento 200x



Figura 4. Pattern capillaroscopico di mucosa masticatoria vestibolare del V sestante su soggetto sano (femmina di 64 anni). La visibilità appare ridotta. Ingrandimento 200x.

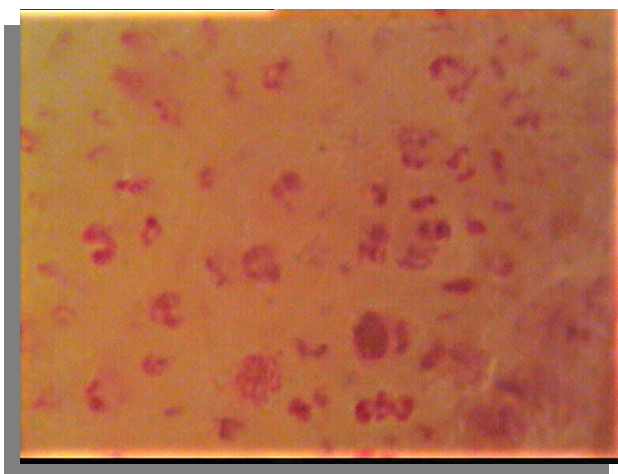


Figura 5. Pattern capillaroscopico di mucosa masticatoria vestibolare del II sestante su paziente diabetico (uomo di 58 anni). I capillari appaiono distorti e ingranditi. La loro disposizione non è a capocchia di spillo e si rinvengono morfologie del tutto atipiche per questo distretto mucosale. Si notano microemorragie e capillari ‘a coccarda’. Ingrandimento 200x.



Figura 6. Pattern capillaroscopico di mucosa masticatoria vestibolare del II sestante su paziente diabetico (uomo di 63 anni). Si nota l’aumento di densità capillare a livello del parodonto superficiale. I capillari presentano la caratteristica morfologia a “macchie di ghepardo”. Sono presenti aree di avascularizzazione. Ingrandimento 200x.

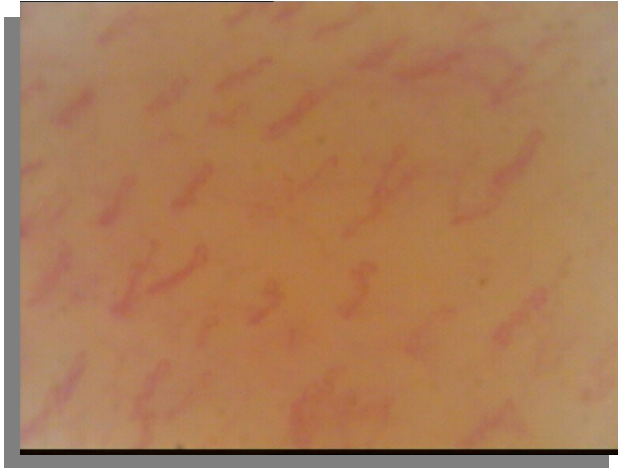


Figura 7. Quadro capillaroscopico di mucosa labiale inferiore su soggetto sano (uomo di 59 anni). I capillari, ben visibili, hanno andamento regolare, leggera tortuosità. Non sono presenti ectasie. Ingrandimento 200x

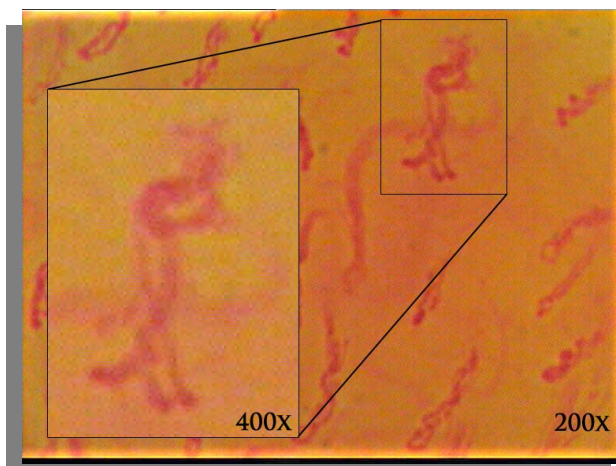


Figura 8. Quadro capillaroscopico di mucosa labiale inferiore su paziente diabetico (uomo di 65 anni). I capillari appaiono distorti, di numero inferiore alla norma, con morfologie atipiche. Ingrandimento a 400x di ansa capillare distorta 'a testa piatta'.



Figura 9. Esame capillaroscopico su mucosa labiale inferiore. Si noti l'angolo di incidenza di 90° tra sonda capillaroscopica e superficie mucosale. La mucosa viene preventivamente asciugata per mezzo di una garzina di cotone per evitare fenomeni di riflessione anomala.



Figura 10. Esame capillaroscopico su mucosa masticatoria del V sestante. La sonda è tenuta perfettamente perpendicolare alla superficie mucosale. La pressione esercitata è minima per non creare fenomeni di ischemia tissutale.



Figura 11. Esame capillaroscopico su mucosa masticatoria del II sestante.



Figura 12. Particolare della sonda ottica. Dal dorso della sonda partono due cordoni: il primo, quello di calibro maggiore, è deputato all'illuminazione; il secondo è deputato alla trasmissione del segnale video.



Figura 13. Particolare dell'ottica 200x selezionata e della cappetta di stanziatrice. Si nota in testa alla sonda ottica la ghiera circolare deputata all'illuminazione. Al centro il terminale ottico della sonda. Sul dorso la ghiera rotante per la messa a fuoco.



Figura 14. Corpo del capillaroscopio. Frontalmente si trovano, da sinistra verso destra, la ghiera di regolazione della luminosità (quantità di luce erogata), l'alloggiamento per il terminale luminoso della sonda, l'alloggiamento per il terminale video della sonda, le regolazioni del punto del bianco, e del contrasto dell'immagine capillaroscopica, il pulsante di accensione/spengimento.



Figura 15. Quadro capillaroscopico di mucosa masticatoria su paziente diabetico con caratteristico aspetto a macchie di grapardo. Ingrandimento 200x.



Figura 16. Quadro capillaroscopico di mucosa masticatoria su paziente sano. Si noti la morfologia 'a capocchie di spillo' dei capillari. Ingrandimento 200x.

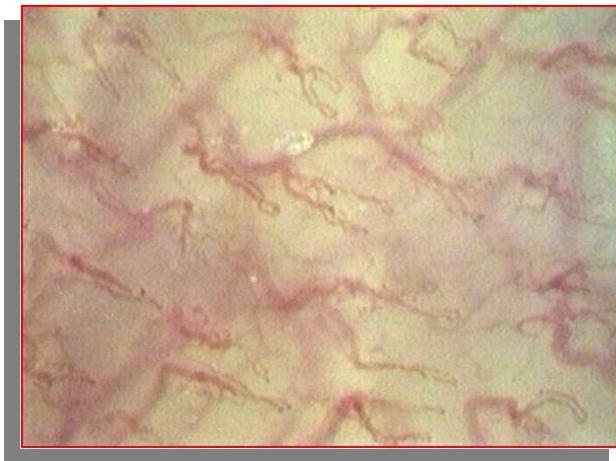


Figura 17. Pattern capillaroscopico di mucosa del labbro inferiore su soggetto sano (200x)



Figura 18. Pattern capillaroscopico di mucosa del labbro inferiore su paziente diabetico (200x)



Figura 19. Pattern capillaroscopico di mucosa del labbro inferiore su paziente diabetico (200x)



Figura 20. Pattern capillaroscopico di mucosa labiale superiore su soggetto sano (200x)



Figura 21. Pattern capillaroscopico di mucosa labiale superiore su paziente diabetico (200x)



Figura 22. Pattern capillaroscopico di mucosa labiale superiore su paziente diabetico (200x)

BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care* 2007; 30 (Suppl. 1):S42–S47.
2. Bucciante L, *Sui fondamenti angio-architetturale e strutturali della regolazione del circolo sanguigno*. *Arch. De Vecchi* 1960; 32: 117-120.
3. Bullinger A, Fagrell B, *Clinical Capillaroscopy. A Guide to its Use in Clinical Researc and Practice*. Hogrefe and Huber Pubbl.Co., Toronto, 1990.
4. Cardillo Piccolino F, Zingirian M, Mosci C, *Classification of proliferative diabetic retinopathy*. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 1987; 225: 245-250.
5. Christopher J, Abularrage MD, et al , *Evaluation of the microcirculation in vascular disease*. *J Vasc Surg*, 2005; 42: 574-81.
6. Coget JM, Merlen JF: *Interet de l'etude de la conjonctive oculaire dans le depistage du prediabete*. *Journal des maladies vasculaires*. Masson, 1989; 14: 68-70.
7. Curri SB, *Anatomia del microcircolo cutaneo: Nuove acquisizione morfo funzionali sulla microangiotettoni- ca distrettuale delle diverse regioni*

- della superficie cutanea e mucosa, indagata con Videocapillaroscopia a Sonda Ottica (VCSO). Flebologia, 1992; 3: 247-58.*
8. Curri SB, *Anatomie microvasculaire de la pesu et des ses annexes. Phlebologie, 1990.*
 9. Curri SB, *Una nuova tecnica capillaroscopica per lo studio della microcircolazione cutanea in sedi corporee di interesse dermo-cosmetologico: la Video Capillaroscopia a Sonda Ottica, XIV Congresso Nazionale Soc.it Med. Est., Tavola Rotonda su 'Misurazione cutanee'. Roma 10-12 aprile 1992.*
 10. De Nicola P, Maggi G, Tassi G. *Microcircolazione atlante*, Edi Ermes, Milano 1993.
 11. DECODE, *Study Group EDEG: Is the current definition for diabetes relevant to mortality risk from all causes and cardiovascular and non-cardiovascular diseases? Diabetes Care 2003; 26: 688-96.*
 12. Del Guercio R, Piovella C, *Manuale di capillaroscopia per la clinica*, ed. Minerva Medica, Torino 1995; 37-50.
 13. Ditzel J, Beaven W, Renold AE, *Early vascular changes in diabetes mellitus. Metabolism, 1960; 9: 400-407.*
 14. Fuga GC, Marmo W, Di Palma A, Eibenschutz L, Legnetti F, Acierni F, *Computerized capillaroscopy, image analysis and statistics of seven years observation on subject exposed to vibratine instruments risk. Microcircolazione Oggi, 1991; 8: 28-32.*
 15. Gallucci F, Russo R, Buono R, Acampora R, Madrid E, Uomo G, *Indications and results of videocapillaroscopy in clinical practice. Advances in Medical Sciences, 2008; 53(2) : 149-157.*

16. Goichot-Bonnat L., *Conjunctival capillaroscopy*. Revue du Praticien, 1989 Jan 26; 39 (2): 135-8.
17. Gordon Phyllis A., *Effects of diabetes on the vascular system: Current research evidence and best practice recommendations*. J Vasc Nurs, 2004; 22: 2-11.
18. Goswami D, Goswami R, Banerjee U, Dadhwal V, Miglani S, Lattif AA, Kochupillai N. *Pattern of Candida species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy*. J Infect, 2006 Feb; 52(2): 111-7.
19. Guzzo G. *La Capillaroscopia in medicina*. Milano: EDRA, 1996.
20. Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK, *Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals: does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes?* JAMA, 1990; 263: 2893–8.
21. Halfoun VLRC, Pires MLE, Fernandes TJ, Victor F, Rodrigues KK, Tavares R, *Videocapillaroscopy and Diabetes mellitus: area of transverse segment in nailfold capillar loops reflects vascular reactivity*. Diabetes Research and Clinical Practice , 2003; 61: 155-160.
22. Herman WH., *Diabetes epidemiology: guiding clinical and public health practice*. Diabetes Care, 2007; 30: 1912–9.
23. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, Nauck M, Kocher T, *Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss*. J Clin Periodontol, 2009; 36: 765–774.

24. Laakso M, Lehto S: *Epidemiology of risk factors of cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance*. *Atherosclerosis*, 1998; 137: 565–73.
25. Lagrue G, Kamalodine T, Berge G, Amadeo-Cattaneo A, Grouberhan D, *La biomicroscopie conjonctivale: son interet pour l'etude de la microangiopathie diabetique*. *Rev. Fr. Endoc. Clin.*, 1979; 20: 29-33.
26. Lambova SN ,Ladner UM , *The specificity of capillaroscopic pattern in connective autoimmune diseases. A comparison with microvascular changes in diseases of social importance: arterial hypertension and diabetes mellitus*. *Mod Rheumatol*, 2009; 19: 600–605.
27. Langeron, Crocchel, *Le phenomene de Raynoud; aspect cliniques, etiopathogène-nique et therapeutiques*. *L'expansion scientifique française*, Paris, 1960.
28. Liao D, Shofer JB, Boyko EJ, Mc Neely MJ, Netti DL, Khan SE, Fujimoto WY, *Abnormal glucose tolerance and increased risk for cardio vascular disease in Japanese Americans with normal fasting glucose*. *Diabetes Care*, 2001; 24: 39–44.
29. Maricq HL. *Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and relate disorders*. *Arthritis Rheum*, 1980; 23: 183.
30. Merlen JF, Allegra C, *La rete capillare, le sue origini e le sue conseguenze diagnostiche*. *Microcircolazione oggi*, 1986;32: 49-56.
31. Merlèn JF, *La Microcirculation*. *Vie Medical*, 1969; 40: 5115-20.
32. Messina P, Scardina GA, Garofalo G., *Esame videocapillaroscopico della mucosa orale. Evoluzione delle tecniche*. *Dental Cadmos*, 2002; 9: 95-106.

33. Messina P, Scardina GA, *Study of the microcirculation of oral mucosa in healthy subjects*. Ital J Anat Embryol, 2003; 108: 39-48.
34. Migliau G, Pignata D, Selli E, Tallarico D, Placanica G, Zaino S, *Le alterazioni del microcircolo nei soggetti diabetici*. Esperienze anno XI 1996; 3: 21-31.
35. Motta-Silva AC, Aleva NA, Chavasco JK, Armond MC, França JP, Pereira LJ. *Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures*. Mycopathologia, 2010 Mar; 169(3): 215-23. Epub 2009 Sep 17.
36. Pascotto F, Cotticelli G, Milone G, Del Guercio M, *La microangiopatia diabetica: rilievi biomicroscopici congiuntivali e fluorangiografici retinici*. XIII Cong. Naz. Soc. It. di Microangiologia e Microcircolazione. Roma 10-13 settembre 1987.
37. Petruzzo, Brotzu, *Capillaroscopia: metodica diagnostica nella microangiopatia diabetica*. XIII Congr. Naz. Soc. It. di Microangiologia e Microcircolazione.
38. Ponte E, Tabaj D, Maglione M, Melato M, *Diabetes mellitus and oral disease*. Acta Diabetol, 2001; 38: 57-62.
39. Ponte E, Tabaj D, Maglione M, Melato M, *Diabetes mellitus and oral disease*. Acta Diabetol, 2001; 38: 57-62.
40. Pratesi F. *Microcircolazione e microangiologia*, ed. Minerva Medica, Torino 1990.
41. Ramachandran A, Snehalatha C: *Early diagnosis and prevention of diabetes in developing countries*. Rev Endocr Metab Disord, 2008; 9: 193-201.

42. Research Laboratories Merck, *The Merck Manual* quinta edizione. Pag 1351, Milano, Springer-Verlag, 2008. ISBN 978-88-470-0707-9
43. Rolka DB, Narayan KM, Thompson TJ, Goldman D, Lindenmayer J, Alich K, et al, *Performance of recommended screening tests for undiagnosed diabetes dysglycemia*. Diabetes Care, 2001; 24: 1899.
44. Saudek CD, Herman WH, Sacks DB, Bergenstal RM, Edelman D, Davidson MB, *A new look at screening and diagnosing diabetes mellitus*. J Clin Endocrin Metab, 2008.
45. Scardina GA, **Cacioppo A**, Carini F, Ruggieri A, Valenza V, Messina P. *Periodontal morphological microcirculation in oral lichen planus*. Ital J Anat Embryol, 2007 Oct-Dec; 112(4): 281-91.
46. Scardina GA, **Cacioppo A**, Messina P, *Anatomical evaluation of oral microcirculation: capillary characteristics associated with sex or age group*. Ann Anat, 2009 Oct; 191(4): 371-8. Epub 2009 Jun 9.
47. Scardina GA, Carini F, Leone A, Valenza V, Messina P, *Periodontal panoramic capillaroscopy: a new diagnostic method*. Dental & Medical Problems, 2004; 41: 449-53.
48. Scardina GA, Carini F, Messina P, *L'esame capillaroscopico orale: nuova metodica diagnostica*. Reumatismo, 2005; 57(4): 295-304.
49. Scardina GA, Carini F, Messina P, *Vasodilatation of human gengiva and neurogenic inflammation*. Clin Hemorheol Microcirc, 2005; 32: 279-85.
50. Scardina GA, Messina P, *Morphologic changes in the microcirculation induced by chronic smoking habit: a videocapillaroscopic study on the human gingival mucosa*. American Journal of Dentistry, 2005 Aug; 18(4): 301-4.

51. Scardina GA, Picone V, **Cacioppo A**, Messina P. *Study of microcirculation in oral lichen planus by video-capillaroscopy*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007 Apr; 103(4): e30-4. Epub 2007 Jan 22.
52. Scardina GA, Pisano T, **Cacioppo A**, Messina P., *Periodontal alteration of the microcirculation and hypercholesterolemia: a possible correlation?* South Med J, 2011 Feb; 104(2): 116-20.
53. Scardina GA, Ruggieri A, Messina P, *Correlation of " in vivo" microcirculation and degeneration of the basal cells of the epithelium in lingual lichen planus*. Indian J Dent Res, 2009 Oct-Dec; 20(4): 407-11.
54. Shimitzu K, Kobauyashi Y, Muraoka K, *Midperipheral involvement in diabetic retinopathy*. Ophthalmology, 1981; 88: 610-612.
55. Snehaltha C, Mary S, Joshi VV, Ramachandran A, *Beneficial effects of strategies for primary prevention of diabetes on cardiovascular risk factors. Results of the Indian diabetes prevention programme*. Diab Vasc Dis Res, 2008; 5: 25-9.
56. Tesi M. *La Microcircolazione, concetti e idee in evoluzione, Microcircolazione oggi* , 1991; 8: 11-27.
57. Tsai C, Hayes C, Taylor GW, *Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population*, Community Dent Oral Epidemiol , 2002; 30: 182-92.
58. Verdaguer J, Le Clercq N, Holuigne J, Muselem R, *Non proliferative diabetic retinopathy with significant capillary non perfusion*. Graefe's Arch. Clin. Exsp. Ophthalmol, 1987; 225: 157-159.