



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA

INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

BIOMEDICINA COMPUTACIONAL

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES DE
DOENÇA PERIODONTAL EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 2

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção
do grau de Mestre em Medicina Dentária*

Por:

Andreia Soraia Pinto Hortênsio

Viseu, Ano Letivo 2014/2015



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA

INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

BIOMEDICINA COMPUTACIONAL

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES DE
DOENÇA PERIODONTAL EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 2

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção
do grau de Mestre em Medicina Dentária*

Por:

Andreia Soraia Pinto Hortênsio

Sob a orientação da Professora Doutora Marlene Barros

Viseu, Ano Letivo 2014/2015

“You the people have the power, the power to create machines, the power to create happiness! You the people have the power to make this life free and beautiful, to make this life a wonderful adventure!”
Charlie Chaplin

Agradecimentos

À professora Doutora Marlene Barros, orientadora deste projeto, pelos ensinamentos e pelas palavras sábias nos momentos oportunos,

À professora Doutora Maria José Correia e ao professor Doutor Nuno Rosa pelo apoio e auxílio prestados sempre que precisei,

À minha família, em especial aos meus pais, pelo possível e impossível que fizeram para chegar até aqui e por nunca terem deixado de acreditar.

Ao Nuno, pela enorme paciência, pela confiança e pelo amor,

Ao Casal Ventoso e seus hóspedes, os pilares destes 5 anos, pela partilha, pela amizade e por me terem feito crescer,

À Beatriz, pelas manhãs não dormidas, pelo trabalho em conjunto, pelos bons e maus momentos que sempre soubemos ultrapassar,

Aos que trabalham no SalivaTec, em especial à Mónica e ao Eduardo, que foram incansáveis,

À Unidade de Saúde - Grão Vasco, na pessoa do Dr. Lemos, pela simpatia e disponibilidade para a realização das recolhas de saliva naquela instituição,

Ao Magno e à praxe, que marcaram esta aventura pelos ensinamentos,

Ao QREN, no âmbito do Mais Centro-Programa Operacional Regional do Centro pelo financiamento do SalivaTec onde se desenvolveu este trabalho,

À Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional das Beiras, aos professores e aos funcionários, com quem tive o prazer de me cruzar durante os últimos cinco anos, pelos conhecimentos transmitidos.

A todos, um enorme bem-haja.

Nota Prévia

Ao longo deste trabalho irão ser apresentados termos na língua Inglesa cuja tradução não foi realizada com vista a manutenção do seu significado original. A classificação de proteínas de acordo com um sistema de classificação de ontologias pressupõe a sua utilização em língua Inglesa, por forma a evitar ambiguidades e perdas de significados do ponto de vista biológico (1).

ÍNDICE

Nota Prévia	V
1. INTRODUÇÃO E ENQUADRAMENTO TEÓRICO	1
1.1. Periodontite Crónica.....	1
1.1.1. Etiologia e Fatores de Risco.....	1
1.1.2. Diagnóstico e Classificação.....	2
1.1.3. Fisiopatologia.....	3
1.2. Diabetes Mellitus Tipo 2	14
1.2.1. Epidemiologia e Etiologia	14
1.2.2. Sintomas e Complicações	14
1.2.3. Fisiopatologia em Diabetes Mellitus	15
1.2.4. Alterações na Cavidade Oral.....	16
1.3. A ferramenta bioinformática OralCard	19
1.4. Saliva	19
1.4.1. Saliva como fluido de diagnóstico	20
1.4.2. Biomarcadores salivares	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1. Procedimento experimental realizado.....	23
2.2. Caracterização do grupo em estudo	24
2.3. Calibração dos Examinadores	25
2.4. Exame Clínico Periodontal.....	25
2.5. Recolha da Saliva	26
2.6. Processamento e Armazenamento das Amostras	27
2.7. Controlo de Qualidade das Amostras	27
2.8. Quantificação dos Biomarcadores em saliva	28
2.9. Análise Estatística	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Caracterização demográfica e clínica dos grupos de estudo.....	31
3.2. Caracterização das amostras de saliva recolhidas	32
3.3. Quantificação dos Biomarcadores	34
4. CONCLUSÕES	45
5. BIBLIOGRAFIA.....	47
APÊNDICES.....	57

ANEXOS	69
---------------------	-----------

Índice de Figuras

Figura 1 - Fluxograma.....	23
Figura 2 - Eletroferograma tipo, obtido com sistema Experion™ Automated Electrophoresis Station, associando o tempo de migração à fluorescência.....	28
Figura 3 - Cabeçalho da base de dados no Microsoft® Excel® para Mac 2011, onde foram introduzidas as informações relativas às amostras. ..	29
Figura 4 - Caracterização das amostras recolhidas, por grupo de estudo, e análise estatística dos resultados. A– Volume total; B– Concentração de proteína; C– pH.	35
Figura 5 - Eletroferograma. Perfil de proteínas das amostras pertencentes aos grupos de estudo, obtido no Experion™ Automated Electrophoresis Station. O perfil a vermelho corresponde a uma amostra do grupo Controlo; a azul ao grupo DP; a verde ao grupo DP+DM. Os valores acima do eixo dos X são correspondentes ao peso molecular.	36
Figura 6 - Média da concentração da CCL3 e da CCL13, para cada grupo de estudo.....	40
Figura 7 - Relação entre grupos de estudo relativamente à concentração de quimiocinas observada no Multiplex. A - CCL3; B - CCL13.....	41
Figura 8 - Quadro resumo das vias de polarização e expressão dos vários tipos de macrófagos com a quantificação das citocinas/quimiocinas existente no OralCard para a periodontite crónica. WS – whole saliva; FC – fluido crevicular. Fonte: OralCard.	44

Índice de Tabelas

Tabela 1- Regulação da CCL3 e da CCL13 na Periodontite Crónica e na Diabetes Mellitus tipo 2. Fonte: Oral Card.	19
Tabela 2 - Distribuição por género dos grupos de estudo	32
Tabela 3 - Distribuição por idade dos grupos de estudo.....	32
Tabela 4 - Caracterização clínica dos grupos de estudo.	32
Tabela 5 - Análise dos valores mínimos e máximos, média e desvio padrão de pH obtidos por grupo de estudo.....	36

Tabela 6 – Relação entre os pesos moleculares obtidos para as amostras dos diferentes grupos de estudos, proteínas com correspondência a esse peso e patologias onde essas proteínas podem estar presentes, com a regulação conhecida para essas. WS – *whole saliva*; FC – fluido crevicular. Fonte: OralCard.....38

Lista de Abreviaturas

AGEs	Produtos finais da glicosilação
APC	Células apresentadoras de antígenos
BOP	Sangramento à sondagem
CAL	Perda clínica de inserção
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD	Células dendríticas
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DM	Diabetes Mellitus
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DP	Doença periodontal
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FC	Fluído crevicular
IFN-γ	Interferão- γ
IL	Interleucina
ILC2	<i>Type 2 innate lymphoid cells</i>
IP	Índice de placa
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
LTB4	Leucotrieno B4
M1	Macrófago inflamatório clássico
M2	Macrófago alternativamente ativado
MAMP	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MHCI	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHCII	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon</i>
MIP-1α	<i>Macrophage inflammatory protein-1α</i>
MMPs	Metaloproteinases da matriz

NK	<i>Natural killer</i>
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Proteína C-reativa
PD	Profundidade de sondagem
PC	Periodontite crónica
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PRPs	Proteínas ricas em prolina
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
RAGEs	Recetor dos produtos finais da glicosilação
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
ROS	Espécies reativas de oxigénio
sCD40L	<i>Soluble CD40 ligand</i>
SDF-1	<i>Stromal-derived factor-1</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor- β</i>
Th	<i>T-helper</i>
Th1	<i>T-helper 1</i>
Th17	<i>T-helper 17</i>
Th2	<i>T-helper 2</i>
TIMP	Inibidor tecidual das metaloproteinases da matriz
TNF-α	Factor de necrose tumoral- α
Treg	T reguladoras
WS	<i>Whole saliva</i>

Resumo

Introdução: A periodontite (doença inflamatória induzida por microrganismos que afeta as estruturas de suporte do dente) e a Diabetes Mellitus tipo 2 (patologia endócrina associada à hiperglicemia) são doenças crónicas com elevada prevalência na sociedade moderna. As alterações de expressão das proteínas associadas à fisiopatologia das doenças são passíveis de ser avaliadas na saliva, tornando possível o diagnóstico não invasivo.

Objetivos: Quantificar em saliva de pacientes portadores de doença periodontal e diabetes tipo 2, potenciais biomarcadores propostos por estudos *in silico* realizados a partir de informação relativa do perfil de expressão dos marcadores em pacientes só com uma das doenças, periodontite crónica ou diabetes tipo 2.

Materiais e métodos: Recolha e processamento de saliva em pacientes com periodontite crónica, com e sem Diabetes Mellitus tipo 2, segundo o protocolo do SalivaTec da Universidade Católica Portuguesa. Armazenamento das amostras segundo as indicações do Biobanco do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa. Avaliação da *chemokine (c-c motif) ligand 13* (CCL13) (Q99616) e *chemokine (c-c motif) ligand 3* (CCL3) (P10147), 2 quimiocinas indicadoras das sub-populações de macrófagos e de linfócitos Th, presentes em inflamação crónica. A quantificação das quimiocinas foi realizada por tecnologia Multiplex.

Resultados: Foram recolhidas amostras de saliva de 22 pacientes saudáveis, 14 pacientes com periodontite crónica e 28 pacientes com periodontite crónica e diabetes tipo 2. Apesar de terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os três grupos de estudo para a CCL3 e para a CCL13, apenas as comparações entre o grupo dos saudáveis e o grupo de pacientes com doença periodontal e diabetes tipo 2 foram significativas, para ambas as quimiocinas.

Conclusões: Os resultados deste trabalho indiciam que o perfil de expressão de proteínas em doentes multi-comprometidos é distinto dos valores de expressão das mesmas quimiocinas em pacientes com apenas uma das

doenças, diabetes tipo 2 ou doença periodontal, comprovando a necessidade de estudos desta natureza para a validação de biomarcadores.

Palavras-chave: Periodontite Crônica, Diabetes Mellitus tipo 2, Biomarcadores salivares, Diagnóstico salivar, Tecnologia Multiplex

Abstract

Introduction: Periodontitis (inflammatory disease induced by microorganisms that affect the tooth supporting structures) and Type 2 Diabetes Mellitus (endocrine pathology associated with hyperglycemia) are chronic diseases that are highly prevalent in modern society. The protein expression alterations associated with the pathophysiology of the disease are likely to be assessed in saliva, enabling the noninvasive diagnosis.

Objectives: To quantify, in saliva of patients with periodontal disease and type 2 diabetes, potential biomarkers proposed by *in silico* studies based on the relative information of the markers expression profile in patients with only one disease, chronic periodontitis or type 2 diabetes.

Materials and Methods: Collection and processing of saliva in patients with chronic periodontitis, with and without type 2 diabetes, according to the SalivaTec protocol from Universidade Católica Portuguesa. Storage of samples following the guidelines of Biobanco from Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa. Evaluation of *chemokine (CC motif) ligand 13* (CCL13) (Q99616) and *chemokine (CC motif) ligand 3* (CCL3) (P10147), two chemokines indicators of the Th subpopulations of lymphocytes and macrophages present in chronic inflammation. Quantification was performed by multiplex technology.

Results: Saliva samples from 22 healthy patients, 14 patients suffering from chronic periodontitis and 28 patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes were collected. Although statistically significant ($p < 0.05$) differences were found among the three study groups for CCL3 and the CCL13, only comparisons between the group of healthy and the group of patients with periodontal disease and type 2 diabetes were significant for both chemokines.

Conclusions: The results of the present work indicate that the protein expression profile in multi-compromised patients is distinct from the expression values of the same chemokines in patients with only one disease, type 2 diabetes or periodontal disease, demonstrating the need of such studies for the validation of biomarkers.

Key-words: Chronic periodontitis, type 2 Diabetes Mellitus, Salivary biomarkers, salivary diagnostic, Multiplex technology

1. INTRODUÇÃO E ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1.1. Periodontite Crónica

1.1.1. Etiologia e Fatores de Risco

Considerada a maior causa de perda dentária em adultos (2), a periodontite crónica é uma doença inflamatória que consiste na perda de inserção por destruição do ligamento periodontal e perda do osso subjacente (3–5).

A resposta inflamatória do hospedeiro ao crescimento de um grupo de bactérias, predominantemente Gram-negativas anaeróbias (mais especificamente *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), é a principal causa desta perda dos tecidos de suporte que rodeiam o dente (6,7). Hajishengallis *et al.* (8) colocou a hipótese de existir uma disbiose do microbiota periodontal, ou seja, uma alteração da abundância dos componentes do microbiota em comparação com a sua abundância na saúde, levando a alterações na relação entre os microrganismos e o hospedeiro, dando início à inflamação. O mesmo autor refere ainda que a *P. gingivalis* prejudica a imunidade inata de tal modo que altera o crescimento e desenvolvimento de todo o biofilme, provocando mudanças destrutivas na interação homeostáticas entre hospedeiro e microrganismo no periodonto, sendo esta a bactéria um agente patogénico-chave a provocar a doença periodontal.

O aparecimento e progressão da periodontite é influenciado por fatores como o microbioma oral, a idade, o tabagismo, a dieta, a suscetibilidade genética, o stress e uma higiene oral precária (9,10). As doenças sistémicas estão, também, intimamente relacionadas com as doenças orais, tendo inclusivamente fatores de risco em comum, como é o caso da Diabetes tipo 2 (9).

1.1.2. Diagnóstico e Classificação

O diagnóstico da doença periodontal é baseado na avaliação clínica tradicional, sendo fundamentado pela presença e extensão da inflamação gengival, designada de sangramento à sondagem ou BOP (*bleeding on probing*); pela profundidade à sondagem ou PD (*probing depth*); pela perda de inserção ou CAL (*clinical attachment loss*); e pelo padrão e extensão da perda óssea alveolar, avaliada radiograficamente. Deverão ainda ter-se em conta, para fins de diagnóstico os seguintes pontos: idade, recessão gengival (distância da junção amelocementária do dente até à margem gengival), envolvimento de furca, mobilidade dentária, histórico clínico, tratamento prévio e os sinais e sintomas associados, incluindo dor, ulceração e depósitos microbianos (quantidade de placa bacteriana e de cálculo observável) (11–13). A avaliação radiográfica da extensão e padrão de perda óssea alveolar, bem como da sua progressão ao longo do tempo, também tem sido empregue na mensuração da severidade e extensão da doença periodontal, nomeadamente através das ortopantomografias (11).

No sistema de classificação de 1999 da *American Academy of Periodontology* (AAP), existem sete tipos gerais de doenças periodontais induzidas por placa: 1) gengivite, 2) periodontite crónica, 3) periodontite agressiva, 4) periodontite como uma manifestação de doenças sistémicas; 5) doenças periodontais necrosantes, 6) abscessos do periodonto, e 7) periodontites associada a lesões endodônticas (12,14,15). A acrescentar à classificação dos tipos das doenças periodontais estão, ainda, a severidade da patologia e a sua extensão/distribuição intraoral. No caso da periodontite, está recomendado que a severidade seja categorizada com base na perda de inserção: leve=1-2mm; moderada=3-4mm; avançada \geq 5mm. No que diz respeito à extensão/distribuição da doença periodontal, considera-se localizada se afeta até 30% dos dentes e generalizada se afetar > 30% dos mesmos (14).

1.1.3. Fisiopatologia

O periodonto saudável é mantido por uma resposta inata eficaz à microflora comensal (não patogénica) da placa dentária, limitada à margem gengival, na qual os neutrófilos desempenham um papel crucial, regulados por baixos níveis de citocinas, como a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-8 (IL-8) (10). Como referido anteriormente, em situação normal, a periodonto é colonizado de forma equilibrada, sem que haja disbiose. No entanto, na patogénese da periodontite existe desregulação desta interação entre o microbiota e os tecidos do hospedeiro, por fatores ambientais, como o tabagismo, a idade, as doenças sistémicas e a suscetibilidade genética (10).

A doença periodontal tem uma evolução cronológica que depreende 4 estágios: *colonização* (desregulação e acumulação do biofilme bacteriano no sulco gengival); *invasão* (penetração das bactérias no epitélio e no tecido conjuntivo da gengiva adjacente ao dente); *inflamação* (estimulação e ativação da resposta imune inata e adquirida por parte do hospedeiro); e *perda tecidual* (destruição irreversível da ligação do tecido conjuntivo à superfície dentária) (16). Esta destruição tecidual, característica da periodontite, leva, eventualmente, ao compromisso da função e perda dentária (10).

1.1.1.1. *Imunidade Inata na doença periodontal*

As células epiteliais, os fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal, os osteoblastos e as células dendríticas são algumas das células residentes envolvidas na resposta imune inata. As células epiteliais secretam IL-8, uma quimiocina que aumenta a migração dos neutrófilos e contribui igualmente para a adesão dos monócitos aos vasos sanguíneos e sua consequente saída para os tecidos. Os neutrófilos invadem o periodonto, levando ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , interleucina-6 (IL-6), e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Estas citocinas contribuem para a regulação dos mecanismos moleculares de destruição do tecido periodontal, estimulando a osteoclastogénese. Os monócitos residentes nas margens do tecido ósseo podem diferenciar-se em

osteoclastos através de diferentes vias de regulação dependentes de citocinas pró-inflamatórias, produzindo por sua vez citocinas inflamatórias (17–19).

As células dendríticas (CDs) outro tipo de células apresentadoras de antígenos (APC) presentes na barreira epitelial, expressam receptores *toll-like* (classe de receptores de reconhecimento de padrões moleculares microbianos). Diferentes subpopulações de células dendríticas bem como de macrófagos, expressam distintos receptores *toll-like*, estando estes associados a mecanismos de ativação de subpopulações específicas de linfócitos Th. As células dendríticas uma vez ativadas por antígenos produzem interleucina-12 (IL-12) e interleucina-18 (IL-18) que por sua vez regulam a secreção do interferão- γ (IFN- γ) pelas células *natural killer* (NK) e, mais tardiamente, pelas células T (17,19).

Os fibroblastos do ligamento periodontal e os fibroblastos gengivais são as principais células do tecido conjuntivo periodontal aos quais os microorganismos têm acesso após o rompimento da barreira epitelial. Como resposta, os fibroblastos secretam citocinas e enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular. Os fibroblastos gengivais produzem TNF- α , IL-6, IL-8, *chemokine (C-C motif) ligand 3* (CCL3) (anteriormente conhecido como *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α)), e *chemokine (C-X-C motif) ligand 12* (CXCL12), também denominada de *stromal-derived factor-1* (SDF-1), importantes reguladores do processo inflamatório e do metabolismo ósseo. A expressão das metaloproteinases da matriz (MMPs) é acentuada nos fibroblastos do ligamento periodontal; no entanto, estas células também contribuem para a inflamação periodontal e perda óssea através da produção e liberação de IL-1 β , IL-6, TNF- α e *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL). As proteínas descritas acima implicadas na sinalização celular e/ou na degradação tecidual contribuem para que os microorganismos possam continuar a invadir o tecido periodontal atingindo a superfície do osso alveolar (17,19).

Estes eventos que representam a primeira resposta à infecção, estabelecem uma inflamação local utilizando a maquinaria celular e molecular da imunidade inata. A permanência da produção de citocinas e a manutenção da presença de neutrófilos uma das populações celulares que caracteriza a

doença periodontal contribuirá para que a osteoclastogénese se estabeleça e que ocorra a consequente perda do osso alveolar (10,17).

1.1.1.2. *Linfócitos T e B e a Imunidade Adquirida em doença periodontal*

Quando a lesão periodontal persiste sem resolução e uma nova comunidade denominada por um microbiota Gram negativo maioritariamente assacarolítico se estabelece, os novos antígenos bacterianos são processados e apresentados aos linfócitos T e B pelas células apresentadoras (macrófagos e células dendríticas). O diálogo dos macrófagos/ células dendríticas com os antígenos e apresentação destes aos linfócitos T (imunidade celular) faz com que estes sejam ativados e se tornem células efectoras capazes de ativar os linfócitos B. Uma vez ativados os linfócitos B, produzem anticorpos moléculas de imunoglobulinas capazes de reconhecer e ligar aos antígenos do microbiota (imunidade humoral) (19).

Os linfócitos T comportam 2 subpopulações que expressão proteínas membranares que funcionam como co-receptores, CD4 e CD8 que apresentam diferentes funções efectoras (19–21).

As células T CD4⁺ *naive* (células *T-helper*) são polarizadas por ação de citocinas específicas e diferenciam-se em diferentes sub-populações com funções efectoras distintas: *T-helper 1* (Th1), *T-helper 2* (Th2), as recentemente descritas *T-helper 17* (Th17) e células T reguladoras (Treg), com papel antagonista e regulador da resposta imunitária (19–21).

As Th1 secretam interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ e as Th2 produzem interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13. Tanto as Th1 como as Th2 produzem interleucina-3 (IL-3) e TNF- α (19,20).

As células T CD8⁺ (células T citotóxicas) são células efectoras imunitárias que secretam citocinas características tanto das Th1 como das Th2 (19,20) e o seu papel como efectoras consiste na indução da morte de células com antígenos intracelulares.

A diferenciação das células T CD4⁺ em células Th17, estimuladoras da formação de osteoclastos, é ativada pela presença de IL-6 e *transforming growth factor- β* (TGF- β) (ativação aumentada pela interleucina-1 (IL-1) e

interleucina-23 (IL-23)), e é controlada pela expressão da IL-1 β e interleucina-2 (IL-2). As Th17, observadas na periodontite crónica, secretam interleucinas 17, 21, 22 e 23, sendo as únicas a produzir as IL-17. A interleucina-17 (IL-17) consiste numa família e citocinas pro-inflamatórias, expressa por células da imunidade inata e adaptativa, como os neutrófilos, eosinófilos, células NK, bem como células epiteliais e do músculo liso, e é composta por 6 membros: 17A-F, sendo a IL-17A e a IL17F produzida em exclusivo por Th17 (10,19–22).

A IL-17E (ou IL-25) não é produzida pela Th17 mas sim pelas Th2, induzindo as citocinas e quimiocinas dessa família. A IL-17 tem ainda como papel reforçar as respostas inatas nas células periodontais através da sinergia com os *microbe-associated molecular pattern* (MAMPs), aumentando a secreção de IL-1 β (10,19–22).

As células Treg regulam a ativação, proliferação e função efetora das células T ativadas, desempenhando um papel essencial na prevenção da ativação inapropriada do sistema imunitário. Têm um papel protetor quando existem danos nos tecidos periodontais e estão presentes na doença periodontal. As citocinas produzidas pelas células Treg são o TGF- β e o *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), que sub-regulam a inflamação. A IL-10, o TGF- β e o CTLA-4 estão descritos como estando implicados na diminuição da progressão da doença periodontal (19,22,23).

Os macrófagos, células apresentadoras de antígenos, são células que fagocitam eficientemente as partículas de antígenos que sejam reconhecidas por recetores de antígeno (*toll-like*, por exemplo) e expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), o qual é reconhecido pelo recetor das células T. São células amplamente distribuídas, que desempenham um papel indispensável na homeostase e defesa. Diferenciam-se a partir de células mononucleares do sangue periférico circulante e migram para os tecidos inflamados. Os macrófagos existem em 2 sub-populações M1 e M2. O macrófago inflamatório clássico (M1) funciona na defesa contra patógenos intracelulares e secreta citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-23), que promovem o desenvolvimento e expansão das Th1. É ativado pelo IFN- γ e por lipopolissacarídeos. Os macrófagos alternativamente ativados (M2) são células importantes na

resolução da inflamação, através de vias anti-inflamatórias, reduzindo a capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias. Segundo Racz *et al.* (23), foram detetados macrófagos em inúmeros infiltrados inflamatórios de indivíduos com periodontite, onde estes desempenham um papel-chave na regulação da resposta imune, não só por apresentarem antigénios às células T, mas também por secretarem uma variedade de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) que, direta ou indiretamente, influenciam a diferenciação e função dos osteoclastos, principais mediadores da reabsorção óssea (19,23–26)

1.1.1.3. Citocinas e Quimiocinas da resposta imunitária

Mensageiras entre as células, as citocinas e as quimiocinas (citocinas quimiotáticas) regulam a resposta imune à infeção (19).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, reguladoras da amplitude e da duração da resposta inflamatória. As vias de sinalização que levam à secreção das citocinas durante o desenvolvimento da periodontite é geralmente dependente da ativação do *receptor activator of nuclear factor- κ B* (RANK) e decorrem da interação de MAMPS (como os lipopolissacarídeos (LPS) e os *pattern recognition receptors* (PRR)), presentes nos tecidos periodontais e nos infiltrados leucocitários. As citocinas ativam as respostas imunes adaptativas por estimulação das APCs, como as CD, as células de Langerhans, e os macrófagos. Após reconhecimento e apresentação dos micro-organismos, as citocinas da resposta inata (IL-1 β , IL-6 e TNF- α ,) são as primeiras a aparecer nas vias da patogénese da doença periodontal (10,19,22).

A IL-1 é o mediador central da imunidade inata e da inflamação e possui sete ligandos com atividade agonista (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ). A IL-1 β é produzida por uma vasta gama de tecidos periodontais e células do sistema imunológico e, como tal, é considerada como tendo múltiplos papéis na resposta imune inata e adaptativa existente na patogénese da periodontite. A IL-1 β atua (normalmente em sinergia com o TNF- α e a prostaglandina E₂ (PGE₂)) na indução de alterações vasculares associadas à inflamação, em particular, na regulação da migração dos

neutrófilos para o periodonto. Na imunidade adaptativa, a IL-1 β estimula a apresentação dos antígenos pelas APCs e influencia o desenvolvimento de células T. Deste modo, a IL-1 β , o TNF- α e a PGE₂ vão ativar os osteoclastos, a secreção de MMPs e a reabsorção óssea alveolar na periodontite crônica (10,17,25).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória multifuncional que tem uma vasta gama de atividades biológicas em diversas células alvo e que regula respostas imunes, reações de fase aguda, a hematopoiese, e o metabolismo ósseo. Secretada por uma vasta gama de células do periodonto, provavelmente como resposta secundária à IL-1 β e à atividade do TNF- α . A IL-6 é importante na regulação, desenvolvimento, proliferação e atividade das células imunes chave (células B, células T e monócitos), bem como dos osteoclastos (que se desenvolvem a partir da linhagem dos monócitos). Esta interleucina é um estimulador da secreção de MMPs nos fibroblastos e é provavelmente uma citocina-chave como resposta inflamatória à placa bacteriana (10,24,27,28).

O TNF- α é uma citocina com várias funções, desde a migração celular até à destruição do tecido. Desempenha um papel crítico na resposta do hospedeiro contra um amplo espectro de infecções bacterianas, contribuindo para a resposta imune inata e adaptativa. O TNF- α induz a sobre-regulação das moléculas de adesão e estimula a produção de quimiocinas, envolvidas na migração de células para os locais infetados e inflamados. Regula ainda, positivamente, a produção de IL-1 β e IL-6, estando correlacionado também com a degradação da matriz extracelular e com a reabsorção óssea, por promover a secreção de MMPs e de RANKL (19,27,29,30).

As quimiocinas desempenham um papel importante na migração de células fagocíticas para o local da infecção. Estas citocinas quimiotáticas, que induzem a migração de leucócitos, são sintetizadas por uma variedade de células incluindo as células endoteliais, epiteliais e do estroma e leucócitos. Funcionalmente, podem ser agrupadas como homeostáticas e inflamatórias. Regulam sinalização em processos biológicos, como angiogénese, proliferação celular, apoptose, metástase tumoral e defesa do hospedeiro. A ligação de uma quimiocina ao seu recetor respetivo inicia o processo de migração celular. As quimiocinas têm como células alvo os leucócitos no

sistema imunitário inato, assim como os linfócitos no sistema imunitário adaptativo (19).

A primeira citocina identificada como possuindo atividade quimiotática foi a *chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL8)*, também conhecida por IL-8. No periodonto, esta citocina é produzida principalmente pelos fibroblastos gengivais, células epiteliais gengivais e células endoteliais, sendo encontrada em tecidos periodontais saudáveis e doentes e associada com a inflamação subclínica da lesão inicial, composta por neutrófilos polimorfonucleares. Esta quimiocina tem um papel importante no metabolismo ósseo, tendo ações diretas sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos (17,19,28,31).

Outra quimioquina crucial da imunidade inata é a *chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)*, também denominada de *monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)*. Esta quimiocina desempenha um papel importante nos processos inflamatórios, tendo sido implicada como fator-chave para o recrutamento e ativação de leucócitos (19,28).

A CCL3 (MIP-1 α) é a quimiocina mais expressa nos tecidos periodontais, estando frequentemente localizada no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio das bolsas dos tecidos gengivais inflamados. Na periodontite crônica, a CCL3, contribui para a presença dos macrófagos e, em conjunto com a CCL5 e a CXCL8, possui um papel importante no metabolismo ósseo, induzindo a migração e ativação dos osteoclastos. Deste modo, é presumível que agrave a severidade da doença periodontal (16,19,31,32).

A CCL13 (ou MCP-4 - *monocyte chemoattractant protein-4*) é expressa em tecidos não linfoides durante a inflamação crônica e atua como um fator quimiotático para atrair monócitos, mas não neutrófilos, em tecidos cronicamente expostos a patógenos exógenos. A MCP-4 tem sido associada a doenças como a artrite reumatóide, a aterosclerose da carótida, asma e inflamação renal. Na periodontite crônica, o recrutamento de macrófagos e as ações anti-apoptóticas contribuem para a permanência destas células nos tecidos periodontais, uma característica compartilhada com outras patologias inflamatórias crônicas (16,33).

O RANKL induz a produção de CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1- α), CCL5 (RANTES - *regulated and normal T cell expressed and secreted*) e CCL9

(MIG – *monokine induced by IFN- γ*) pelos osteoclastos, sugerindo a sua contribuição para a reabsorção óssea. Estudos recentes relatam que as quimiocinas podem contribuir efetivamente para a remodelação óssea por condução da migração e ativação dos osteoblastos (10,19).

O IFN- γ é uma citocina da resposta imunitária adaptativa. A sua principal função é promover a ligação das APCs ao antígeno, por sobre-regular a expressão dos complexos MHC I e MHC II. IFN- γ desempenha um papel importante na maturação das células B e na secreção de imunoglobulinas. Na doença periodontal, IFN- γ está presente em níveis elevados nas lesões, estando associado a lesões progressivas ou às formas mais graves de periodontite (19).

A interleucina-4 (IL-4), outra citocina importante na imunidade adaptativa, induz a proliferação das células T e regula a secreção de imunoglobulinas pelas células B. Considerada uma citocina anti-inflamatória, a IL-4 tem ações anti-tumorais e inibe a atividade de citocinas pró-inflamatórias. Estudos sugerem que a IL-4 regula negativamente a produção de outras citocinas, incluindo a IL-1 β , o TNF- α e a IL-6, pelos monócitos e pelas células Th1, inibindo a transcrição destas citocinas pró-inflamatórias e do IFN- γ . Além disso, a IL-4 inibe a produção de MMPs e de RANKL e, concomitantemente, induz a sobre-regulação do inibidor tecidual das metaloproteinases (TIMP) e da osteoprotegerina (OPG), reforçando o seu potencial papel protetor nas doenças periodontais. A IL-4 também induz a produção de IL-10, outra citocina anti-inflamatória (19,21,24).

TGF- β é um fator de crescimento que regula o desenvolvimento e diferenciação celular e a produção da matriz, sendo também um potente fator imunossupressor regulando negativamente a transcrição dos fatores pró-inflamatórios (como a IL-1 β e o TNF- α) e as MMPs. Em lesões periodontais ativas, os níveis de TGF- β estão negativamente correlacionados com os níveis de RANKL, reforçando o seu papel de proteção contra a destruição tecidual (19).

1.1.1.4. *A Proteína C-Reativa e a Inflamação*

A proteína C-reativa (PCR), sintetizada pelo fígado e pelos adipócitos, tem sido reconhecida como um importante biomarcador para um largo espectro de condições, tais como a inflamação sistêmica, osteomielite, artrite reumatoide e vasculite. É regulada por citocinas como as IL-6, a IL-1 β e o TNF- α , que apresentam a capacidade de estimular a produção da PCR pelos hepatócitos (34–36).

Embora a periodontite seja de natureza crônica, existem elementos pertencentes à fase aguda, como a PCR, que também fazem parte da imunidade inata. Os valores elevados da PCR na periodontite crônica podem ser afetados por fatores como o envelhecimento, a pressão arterial, o consumo de álcool, tabagismo, baixos níveis de atividade física, fadiga crônica, DMT2, alimentação rica em proteínas, distúrbios do sono e depressão. Em pacientes com doença periodontal os altos níveis da PCR também estão associados à presença de infecção pelos patógenos periodontais, em particular a *Porphyromonas gingivalis* (35,37).

1.1.1.5. *Mediadores inflamatórios e a Destruição da Matriz Extracelular*

Os mediadores inflamatórios mais importantes, relacionados com a iniciação e progressão da doença periodontal, passam por uma rede complexa de citocinas pro-inflamatórias, MMPs e prostaglandinas. Relativamente às MMPs, que medeiam a degradação da matriz extracelular, estas são sintetizadas pela maioria dos tipos de células no ligamento periodontal (incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, e osteoclastos), assim como os leucócitos infiltrantes (incluindo os neutrófilos e macrófagos). As MMPs têm uma ampla gama de funções fisiológicas fundamentais, incluindo o desenvolvimento de tecidos, homeostase, e reparação, bem como papéis nas respostas imunes, compreendendo o processamento e apresentação de antígenos, em adição à migração celular. A atividade das MMPs é controlada por alterações no balanço delicado entre

a expressão e a síntese de MMPs e dos seus inibidores (TIMPs) (10,16,19,38).

A transcrição de genes das MMPs é muito baixa no tecido periodontal saudável. Na doença periodontal, o equilíbrio é quebrado e a secreção de MMPs específicas é estimulada pelas seguintes citocinas: IL-1, IL-6, TNF- α . No entanto as MMPs ativas são capazes de ativar outras MMPs através de uma cascata de ativação recíproca. Algumas citocinas estão especificamente relacionadas com determinadas MMPs, como por exemplo, a IL-1 β e o TNF- α que podem estimular a secreção de MMPs 3, 8 e 9 a partir dos fibroblastos gengivais e a secreção MMP-13 a partir dos osteoblastos (10,19).

A CXCL8 recruta neutrófilos para o local contendo biofilme oral e estes secretam citocinas, bem como as MMPs 8 e 9, resultando na degradação da matriz extracelular e na sinalização de outras células efectoras para a produção de MMPs. A principal enzima a degradar o colagénio na periodontite é MMP-8 (ou collagenase 2), produzida principalmente pelos neutrófilos. Esta enzima encontra-se no fluido crevicular e na saliva quando existe doença periodontal e tem como principal função a degradação do colagénio tipo I, tipo II e tipo III. A MMP-9 (gelatinase B) é uma enzima que degrada vários tipos de matriz extracelular, incluindo a membrana basal de colagénio do tipo IV. A MMP-9 é expressa pelos neutrófilos e a sua produção é estimulada por várias citocinas, em particular o TNF- α , *epidermal growth factor* (EGF) e por alguns produtos bacterianos como o LPS (19,30,38).

1.1.1.6. Mediadores inflamatórios e a Reabsorção Óssea

A perda de osso alveolar é uma característica crítica da progressão da doença periodontal sendo esta devida à rutura do equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos desencadeada pela resposta a produtos bacterianos e por citocinas produzidas decorrentes da resposta imunitária. O reconhecimento de LPS por recetores *toll-like* contribui para a estimulação direta da reabsorção óssea, mediada por redes de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e por RANKL e PGE₂ (10,19).

O RANKL e osteoprotegerina (OPG) são os principais reguladores de remodelação óssea e estão diretamente envolvidos na diferenciação,

ativação e sobrevivência dos osteoclastos e dos seus precursores. O RANKL é expresso por osteoblastos, condrócitos, células estromais e outras células mesenquimais, além das células T ativadas e das células B. O RANK é expresso pelos progenitores de osteoclastos, osteoclastos maduros, condrócitos, monócitos/macrófagos e células dendríticas. A OPG é expressa por células do tecido periodontal, incluindo os fibroblastos e as células do ligamento periodontal. O bloqueio da atividade do RANKL por ligação da OPG, inibe significativamente a perda óssea na artrite reumatoide, osteoporose, metástase óssea relacionada com o cancro e a destruição do osso alveolar associada à diabetes, confirmando o papel crítico da tríade RANKL/ RANK /OPG na osteoclastogénese (17,19).

A ativação dos recetores *toll-like 2* e recetores *toll-like 6* por LPS provoca uma maior expressão da RANKL. Além disso, os osteoclastos e os seus precursores expressam recetores *toll-like*, principalmente os recetores 2, 4 e 9. A produção induzida pelos lipopolissacarídeos de IL-1 β através das vias dos recetores *toll-like* pode sobre-regular a RANKL, inibindo a expressão de OPG pelos osteoblastos. O papel crucial do recetores *toll-like 2* passa pela diminuição substancial das respostas aos LPS, uma vez que estes induzem o desenvolvimento e a atividade dos osteoclastos. Assim, os recetores *toll-like* influenciam a resposta inflamatória no microambiente do osso e desempenham um papel crítico na modulação da osteoclastogénese e na perda óssea induzida pela inflamação. As células residentes, segundo evidências recentes, também estão envolvidas na perda óssea, uma vez que os fibroblastos de ligamento periodontal e os precursores de osteoclastos aumentam, sinergicamente, a expressão de genes relacionados com a osteoclastogénese (17,19).

1.2. Diabetes Mellitus Tipo 2

1.2.1. Epidemiologia e Etiologia

A Diabetes Mellitus (DM) é a doença metabólica mais comum entre a sociedade moderna, caracterizada por uma hiperglicemia crónica (39,40). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014, a nível mundial, 9% dos adultos acima dos 18 anos tinham diabetes, prevendo-se que em 2030 seja a 7ª causa de morte no planeta (41). Em Portugal no ano de 2013, de acordo com o Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes de 2014, 13% da população nacional tinha Diabetes Mellitus (onde apenas 7,3% está diagnosticada), sendo mais prevalente em indivíduos do sexo masculino (42).

Anteriormente conhecida como diabetes não insulínica, a Diabetes Mellitus tipo 2 é a forma mais comum da Diabetes Mellitus (90-95%) e tem normalmente uma evolução insidiosa (43,44)

Os fatores genéticos, a idade, a obesidade (sobrepeso ou perímetro abdominal aumentado) e a inatividade física (estilo de vida sedentário) fazem parte dos fatores de risco *major* que levam ao desenvolvimento deste tipo de diabetes (39,43–46)

1.2.2. Sintomas e Complicações

Os sintomas clássicos da Diabetes Mellitus devido à hiperglicemia crónica, passam pela poliúria (excesso de produção de urina), polidipsia (aumento da sensação de sede), perda de peso, por vezes com polifagia (apetite excessivo) e visão turva (6,44).

A longo prazo as principais complicações sistémicas passam por complicações microvasculares (tais como retinopatias, neuropatias e nefropatias) e macrovasculares (como o aumento da incidência de aterosclerose, cardiopatia isquémica, hipertensão) neuropatia autónoma (causando sintomatologia gastrointestinal, genitourinária e cardiovascular e disfunção sexual) e nefropatias (pode conduzir a insuficiência renal terminal).

O carácter crónico desta patologia e o desequilíbrio glicémico destes pacientes podem ainda resultar numa maior suscetibilidade a infeções e no aumento do tempo de cicatrização (2,44,47,48).

1.2.3. Fisiopatologia em Diabetes Mellitus

O defeito fisiopatológico subjacente à DMT2 não implica a destruição autoimune das células β pancreáticas, sendo caracterizada pelas seguintes desordens: resistência periférica à insulina (no músculo esquelético, o tecido adiposo e fígado); produção aumentada de glicose pelo fígado; e, secreção alterada da insulina pelo pâncreas. O aumento da resistência do tecido à insulina geralmente ocorre em primeiro lugar podendo ser, eventualmente, seguido da diminuição da secreção de insulina. O pâncreas continua a produzir insulina, no entanto a resistência à insulina impede o seu uso adequado a nível celular. A glicose não consegue entrar nas células alvo e acumula-se na corrente sanguínea, resultando num estado hiperglicémico. Os níveis elevados de glicose no sangue estimulam um aumento na produção de insulina pelo pâncreas; assim, os indivíduos com DMT2, têm com frequência excesso de produção de insulina (hiperinsulinemia). À medida que o tempo passa, a produção de insulina pelo pâncreas vai diminuindo gradualmente até chegar a valores abaixo dos normais (49).

A resistência à insulina resulta de dois fatores: a diminuição do número de recetores de insulina na membrana celular e a cascata de sinalização intracelular após ligação da insulina no recetor estar comprometida (50).

A relação existente entre a inflamação sistémica e a resistência à insulina, quando o sistema imune se encontra alterado, é um fator determinante na patogénese da DM. A resposta imunológica é caracterizada pelo aumento da contagem de neutrófilos e pela diminuição de linfócitos, sendo o NLR (ratio neutrófilos/linfócitos) é frequentemente reconhecido como um marcador inflamatório para avaliar a gravidade da doença. Os neutrófilos representam o mediador inflamatório inespecífico ativo que inicia a primeira linha de defesa, ao passo que os linfócitos representam a componente reguladora/proteção da inflamação (51).

1.2.4. Alterações na Cavidade Oral

Além das manifestações sistêmicas, a Diabetes Mellitus também está associada a alterações na cavidade oral. O estado de hiperglicemia crônico parece ser um dos fatores etiológicos para a doença periodontal (gingivite e periodontite); xerostomia e disfunção das glândulas salivares; aumento da suscetibilidade a infecções bacterianas, virais e fúngicas (por *Candida albicans*); cáries; abscessos periapicais; perda de peças dentárias; incapacidade para usar próteses dentárias; alterações no paladar; líquen plano, síndrome da boca ardente e atraso na cicatrização tecidual (52–54).

1.2.4.1. Doença Periodontal e a Diabetes Mellitus

A suscetibilidade para a doença periodontal é a complicação oral mais comum da Diabetes Mellitus, sendo considerada a sexta complicação da DMT2, após a retinopatia, a nefropatia, a neuropatia, a doença cardiovascular e a doença vascular periférica (55,56). Os indivíduos com DMT2 têm três vezes mais probabilidade de sofrer de doença periodontal, estando este risco aumentado quando os diabetes não estão controlados (52). A destruição do tecido periodontal e a perda de peças dentárias, além de aumentar com a idade, também é maior quando os pacientes sofrem de DM (54).

Existem alguns mecanismos que relacionam a doença periodontal e a DM. Estes são (57):

1.2.4.1.1. Produtos finais da glicosilação avançada (AGEs)

Os produtos finais da glicosilação avançada e oxidação não enzimática de proteínas e lípidos (AGEs – *advanced glycation end products*), que se acumulam no plasma e no tecido, e a interação com os seus recetores (RAGEs – *receptor for advanced glycation end products*) são considerados um dos grandes responsáveis pelas complicações que ocorrem em pacientes diabéticos (52,54,56,58). Estas complicações surgem na

Diabetes Mellitus como resultado da hiperglicemia crônica e devido à super-produção de mediadores inflamatórios como a IL-1 β , TNF- α e IL-6 (57,59,60).

É genericamente aceite que a produção de AGEs é um dos mecanismos pelo qual a diabetes parece afetar o estado periodontal. Ao facilitar a formação de AGEs e a sua ligação aos RAGEs (ativando monócitos/macrófagos e de células endoteliais, que leva à libertação de citocinas pró-inflamatórias), a Diabetes pode também alterar indiretamente a reticulação da matriz extracelular, bem como as atividades celulares para amplificar reações inflamatórias e diminuir a viabilidade celular. Assim, leva ao comprometimento de cicatrização das feridas (por alteração da estrutura do colagénio), à potencial alteração vascular no tecido periodontal e à degradação acelerada do tecido conjuntivo no osso mineralizado e não mineralizado (2,56,57,59,61).

1.2.4.1.2. Alterações Imunológicas em Diabetes Mellitus

Nos pacientes diabéticos, o estado hiperglicémico pode favorecer o ambiente oral ao crescimento de patógenos periodontais anaeróbios Gram-negativos (como a *Porphyromonas gingivalis*), comprometer a função celular e de defesa do hospedeiro, e induzir a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e secreção de enzimas colagenolíticas (2,57). No entanto, os resultados dos estudos *in vitro* revelaram que a microflora bacteriana encontrada nos doentes diabéticos era semelhante à observada em indivíduos não diabéticos, indicando que a inflamação não se deve aos microrganismos existente mas sim à resposta imune-inflamatória crónica que ocorre nos tecidos periodontais do hospedeiro (2). Esta resposta é caracterizada pela produção local de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (como as interleucinas), prostanóides (por exemplo, as prostaglandinas) e de enzimas destrutivas (tais como as MMPs). A produção excessiva ou desregulada destes mediadores provoca os sinais clínicos da doença, caracterizada pela perda de inserção, destruição do osso alveolar e formação de bolsas periodontais (2,52).

Em resposta aos LPS (endotoxinas) dos microrganismos periodontais, a elevação de citocinas pró-inflamatórias sistémicas (principalmente IL-1 β ,

TNF- α e IL-6) pode perturbar o metabolismo lipídico e a resistência à insulina, consequentemente conduzindo a hiperlipidemia e hiperglicemia. Estas citocinas irão atenuar ainda mais a insensibilidade à insulina, destruindo as células B pancreáticas, antagonizando a ação da insulina, ou alterando a sinalização intracelular mediada pela insulina. O TNF- α induz a resistência à insulina e potencialmente liga a progressão da destruição periodontal ao estado diabético (2,57,59,61).

O tecido adiposo é uma fonte importante de citocinas na diabetes, segregando: hormonas reguladoras do apetite e do metabolismo; citocinas pro-inflamatórias (como o TNF- α e a IL-6) que têm efeito direto sobre as células inflamatórias (incluindo no tecido periodontal); adipocitocinas (como leptina e adiponectina). A leptina é um estimulador importante das respostas inflamatórias, estimulando a quimiotaxia de neutrófilos e a libertação de citocinas pelos monócitos. Os níveis de leptina correlacionam-se com a massa de tecido adiposo, sendo elevados em indivíduos obesos e estando assim associados a um risco aumentado de desenvolver DM2. Assim sendo, quando os níveis de leptina estão elevado nos pacientes com diabetes, estes podem contribuir para a destruição aumentada do tecido periodontal (pela ativação de respostas pró-inflamatórias no periodonto). A adiponectina é geralmente associada a efeitos anti-inflamatórios, estando os seus valores baixos relacionados com a obesidade, a DM e doença cardiovascular (52).

Outro mecanismo que pode interligar a Diabetes Mellitus e a doença periodontal prende-se com a função dos neutrófilos estar diminuída, nos pacientes diabéticos. Esta modificação deve-se à diminuição da quimiotaxia, aderência e ao “adiamento” da apoptose. Esta apoptose tardia leva a um aumento da retenção de neutrófilos nos tecidos periodontais, podendo aumentar o dano tecidual pela libertação de enzimas destrutivas, incluindo MMPs e espécies reativas de oxigénio (ROS), pelos neutrófilos (52,62). Ritchie *et al.* (57), afirmou que em pacientes diabéticos tipo 2, alterações de quimiotaxia de neutrófilos foram associadas a maiores profundidades de sondagem.

1.3. A ferramenta bioinformática OralCard

Para avaliar a informação existente sobre a presença e quantificação das diferentes proteínas associadas aos mecanismos moleculares da doença periodontal e da diabetes é possível recorrer a uma base de dados que reúne informação sobre os dados existentes de proteómica na cavidade oral. O OralCard, que é repositório que contém dados de diversos estudos de proteómica da cavidade oral, manualmente anotados constitui um importante recurso para o melhor entendimento dos fundamentos moleculares envolvidos nos mecanismos biológicos e patológicos da cavidade oral (63,64). Relativamente às citocinas analisadas no presente trabalho a base de dados OralCard disponibiliza dados de regulação para as quimiocinas CCL3 e CCL13. (Tabela 1).

Tabela 1- Regulação da CCL3 e da CCL13 na Periodontite Crónica e na Diabetes Mellitus tipo 2. Fonte: Oral Card.

Código UniProt	Nome da Proteína	Periodontite Crónica (PC)	Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2)	Regulação
P10147	Chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3)	x	-	x18,00 (PD)
Q99616	Chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)	x	-	x4,97 (PD)

1.4. Saliva

A saliva humana é um fluído composto pelas secreções das glândulas salivar *major* (parótida, submandibular e sublingual) e das glândulas salivar *minor*, distribuídas em grande número pela mucosa oral. A saliva colhida no meio oral, conhecida por *whole saliva*, além de ser predominantemente derivada das glândulas salivares, também contém fluído crevicular gengival, secreções brônquicas e expetoração nasal (65). As proteínas ricas em prolina (PRPs), as estaterinas, as cistatinas e as histatinas fazem parte dos quatro grandes grupos de proteínas salivares (66).

A saliva colhida no meio oral, conhecida por saliva total ou *whole*

saliva, além de ser predominantemente derivada das glândulas salivares *major* e *minor*, também contém fluido crevicular gengival, secreções brônquicas e expetoração nasal. O sangue e plasma encontrados derivam de feridas orais, bactérias, produtos bacterianos, vírus e fungos, células descamadas do epitélio, outros componentes celulares e restos alimentares (65).

1.4.1. Saliva como fluido de diagnóstico

A recolha de saliva com intuito diagnóstico pode dar-se a nível das glândulas, de um modo individual, ou através da recolha da saliva presente no meio oral (*whole saliva*). A primeira é útil para avaliar as secreções das glândulas salivares individualmente (parótida, submandibular, sublingual, glândulas salivares menores) e diagnosticar alterações na glândula que se pretende analisar. A análise da *whole saliva* é usada para avaliar desordens sistémicas pois, além de ser mais fácil de recolher, contém constituintes do plasma (65,67,68). No que concerne à colheita da saliva, esta pode ser feita de forma estimulada (mecânica ou química) ou não estimulada (sem estímulos exógenos). A estimulação da secreção salivar pode afetar a sua quantidade, fazendo com que alguns dos seus constituintes também sejam alterados. Na colheita não estimulada o fluxo salivar pode ser modificado pela luminosidade, pela postura do paciente e pelo olfato (67,69,70).

A saliva, quando usada como meio de diagnóstico, tem vantagens reconhecidas: a colheita não é invasiva; é fácil de recolher, armazenar e transportar; não exige técnicos para a sua colheita, podendo ser realizada pelo próprio paciente; o risco de contração de infeções através da saliva é mínimo, em comparação com o sangue e outros fluídos corporais (65,68,70). Além das vantagens citadas anteriormente, a saliva é um fluido continuamente renovado, uma vez que as glândulas salivares, sendo exócrinas, reproduz os perfis das proteínas indicativos da saúde do indivíduo e do seu estado clínico no momento da colheita. Este facto torna possível monitorizar crianças, idosos e pacientes não cooperantes (68).

As desvantagens da saliva como meio de diagnóstico passam pelas variações de determinadas biomoléculas ao longo do dia, não refletindo com confiança as concentrações destas moléculas; pelas alterações que o fluxo salivar pode sofrer aquando da sua recolha e da sua estimulação; pelas concentrações serem bastante inferiores às encontradas no sangue e pela falta de sensibilidade ainda encontrada nos sistemas de detecção (68).

Uma das doenças orais para a qual estão avaliados os diagnósticos salivares é a doença periodontal (65). Atualmente, não existem testes seguros para diagnosticar e prever a progressão da periodontite (10). Os parâmetros clínicos, tais como a profundidade de sondagem, a perda de inserção, o sangramento à sondagem, o índice de placa e avaliação radiográfica da perda óssea alveolar fornecem informações sobre a severidade da patologia, mas não medem a atividade da doença. No entanto, os testes microbiológicos, que analisam a resposta do hospedeiro, e as análises genéticas têm sido propostas como medidas de monitorização e identificação de pacientes com risco aumentado para a periodontite (71).

1.4.2. Biomarcadores salivares

Os biomarcadores, ou marcadores biológicos, são definidos como “alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou genéticas pelo qual um processo normal, anormal ou biológico pode ser reconhecido ou monitorizado”. Assim, devem ser capazes de monitorizar o estado de saúde, suscetibilidade à doença, progressão, resolução e resposta à terapêutica, no que diz respeito a uma determinada condição médica (69,70).

As alterações das proteínas associadas a fisiopatologia das doenças são passíveis de ser identificadas e quantificadas na saliva (72). A análise da proteómica salivar é fundamental para compreender as funções das proteínas salivares e para identificar os biomarcadores específicos para a patologia em diferentes condições fisiopatológicas, ou seja, para se obter informação acerca do estabelecimento, progressão e prognóstico de determinada patologia na pessoa (7,73).

Para a periodontite crónica foram propostos por Rosa *et al.* (16), 7 biomarcadores exclusivos, após estudo funcional. Eles são: *Chemokine (c-c motif) ligand 13* (Q99616), *Thymine phosphorylase* (P19971), *C-C motif chemokine 2* (P13500), *Fibronectin* (P02751), *Angiotensinogen (serpin A8)* (P01019), *Clusterin* (P10909), *Prostaglandin G/H synthase 2 (COX-2)* (P25254).

A quantificação dos biomarcadores CCL3 e CCL13 em pacientes multi-comprometidos com manifestações diversas de doenças associadas à inflamação crónica encontra-se por realizar. Deste modo a comparação da quantificação dos biomarcadores para periodontite crónica em pacientes com a patologia oral e em pacientes que sejam também comprometidos com Diabetes Mellitus tipo 2, permitirá esclarecer se os marcadores propostos em estudos prévios do laboratório SalivaTec continuam a ser válidos para avaliar pacientes multi-comprometidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com a população dos pacientes da consulta de Periodontologia na Clínica Dentária da UCP e da consulta de diabetes na Unidade de Saúde Familiar – Grão Vasco.

2.1. Procedimento experimental realizado

No fluxograma abaixo (Figura 1) encontra-se resumida a metodologia usada neste estudo.

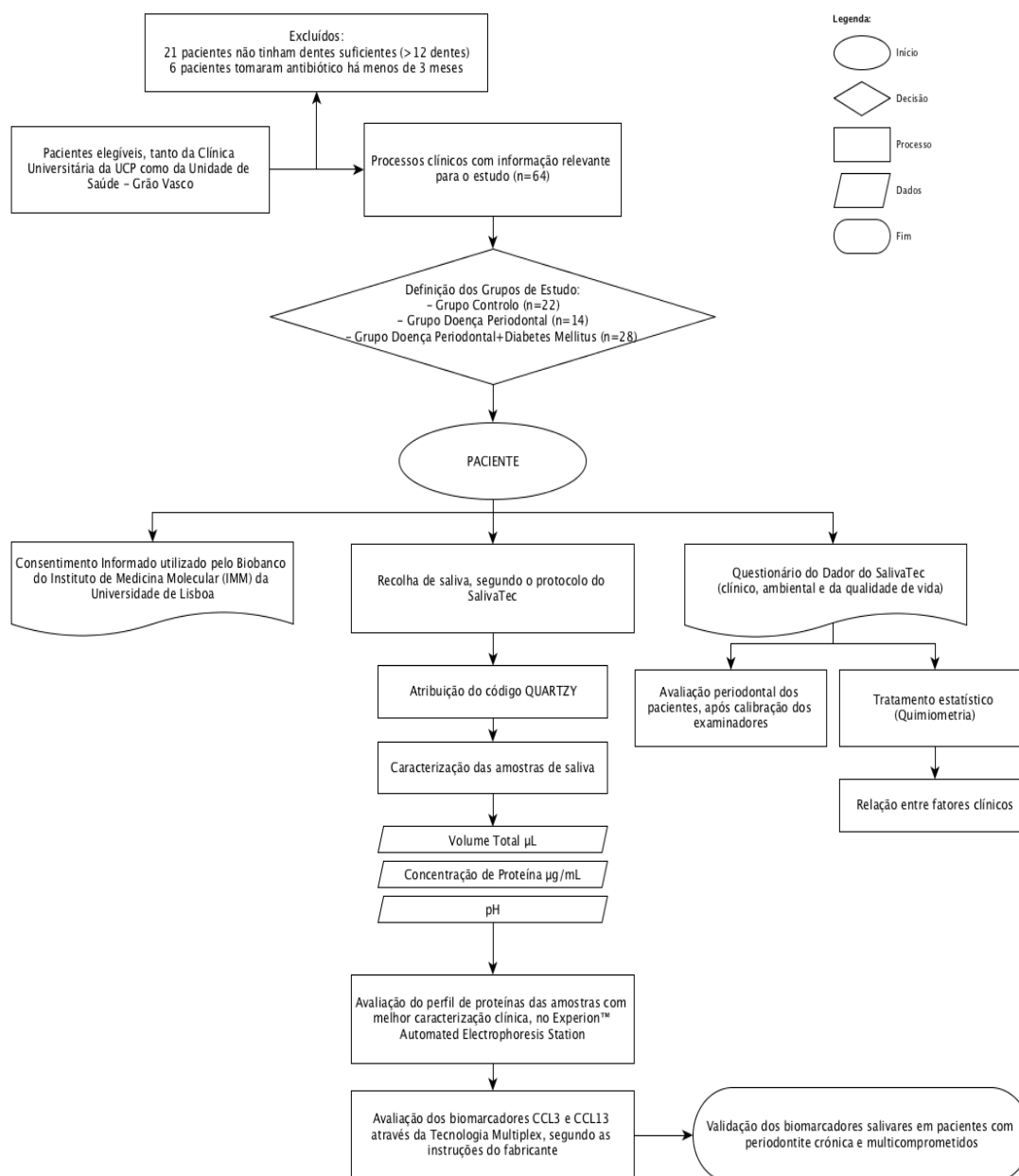


Figura 1 - Fluxograma.

2.2. Caracterização do grupo em estudo

O presente estudo foi conduzido em conjunto com o SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva), do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa (UCP) e aprovado pelo Diretor da Clínica Universitária da UCP.

Os pacientes convidados a participar são utentes da Clínica Universitária da UCP e da Unidade de Saúde Familiar – Grão Vasco, onde tiveram lugar as recolhas de saliva, entre dezembro 2014 e abril de 2015. As entidades anteriores foram previamente sensibilizadas e informadas acerca dos objetivos e da metodologia do estudo.

A sequência da colheita de dados foi a seguinte: 1) Entrega e preenchimento do consentimento informado; 2) Colheita da amostra de saliva; e 3) Entrega e preenchimento do questionário do dador (Apêndice I). O consentimento livre e informado, utilizado pelo Biobanco do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa, foi assinado, individualmente, pelos participantes no estudo, sendo fornecidas informações acerca dos objetivos, procedimentos, benefícios e riscos da colheita bem como acerca da identificação, confidencialidade e conservação das amostras (Anexo I). O questionário entregue teve como objetivo a caracterização dos pacientes a nível clínico, ambiental e qualidade de vida, tendo sido também avaliados relativamente à sua condição periodontal.

De acordo com o seu diagnóstico periodontal e o seu estado de saúde geral, os indivíduos foram incluídos no estudo. Os critérios de inclusão foram: presença de, pelo menos, 12 dentes (74); existência de mais 5 bolsas periodontais com profundidades $\geq 5\text{mm}$ e perda de inserção $\geq 3\text{mm}$ (75). Foram excluídos: pacientes que tomaram antibióticos nos últimos 3 meses (76); que foram submetidos a cirurgia oral há menos de 1 mês; que possuíam histórico de doenças autoimunes, inflamatórias e metabólicas, à exceção da Diabetes Mellitus tipo 2; e grávidas ou lactentes. Os pacientes pertencentes ao grupo de controlo apresentavam $\text{PD} < 3\text{mm}$, em todos os dentes, $\text{BOP} < 10\%$ (77).

O total de 64 indivíduos foi dividido em três grupos de estudos: 22 pacientes com saúde periodontal e sistémica (controlo); 14 pacientes com

periodontite crónica e sem doenças sistémicas (DP); 28 pacientes com periodontite crónica e Diabetes Mellitus tipo 2 (DP+DM).

2.3. Calibração dos Examinadores

Com o objetivo de não comprometer a avaliação periodontal dos pacientes selecionados, foi realizada, segundo uma adaptação do método descrito por Hill *et al.* (78), a calibração dos examinadores.

Foram recrutados 10 pacientes, todos funcionários da Clínica Universitária da UCP, tendo assinado individualmente um consentimento informado para participar no estudo. Foram considerados critérios de inclusão: 1) presença, no mínimo, de 20 dentes; 2) pelo menos, um molar por quadrante; e 3) portadores de doença periodontal (78).

O protocolo de examinação consistiu em duas fases. Primeiramente, o examinador *standard*, mediu o valor de PD e de recessão gengival em 6 superfícies por dente (disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual), em todos os dentes, de todos os pacientes (excluindo os terceiros molares e implantes). Foi utilizada uma sonda periodontal clique-probe. Posteriormente, os examinadores A e B efetuaram o mesmo procedimento nos mesmos pacientes, tendo sido medido um quadrante por paciente (em dias diferentes e por ordem aleatória). Este último ponto deve-se ao fato de que o valor de PD aumenta com medições repetitivas (79). A sequência de examinação, entre os examinadores A e B, foi alternada.

2.4. Exame Clínico Periodontal

Todos os pacientes foram avaliados clinicamente por um examinador calibrado. O exame oral ficou registado através do preenchimento do índice de CPO (80) e o grau de higiene oral foi analisado através do índice de placa (IP), onde ficou mencionada a existência e quantidade de placa bacteriana

observada (sem corante), nas quatro superfícies de cada peça dentária (vestibular, mesial, lingual e distal) (55). A profundidade à sondagem e a perda clínica de inserção foram medidas através de uma sonda periodontal (15mm de comprimento e 0,5mm de diâmetro na ponta) (39), sendo a PD a distância a partir da margem da gengiva até à base do sulco/bolsa periodontal e a CAL a distância entre a junção amelocementária do dente e a base do sulco/bolsa periodontal. A mesma sonda periodontal também foi utilizada para avaliar o sangramento à sondagem, sendo este positivo se existisse sangramento até 20 segundos após a sondagem (76). Estas medições foram realizadas em seis sítios por dente (mesio-vestibular, a meio da face vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, a meio da face lingual e disto-lingual), de todos os dentes presentes em boca.

2.5. Recolha da Saliva

As colheitas foram realizadas de manhã, tendo os dadores tomado o pequeno-almoço ou feito a higiene oral, pelo menos, uma hora antes da mesma. O material utilizado na colheita foi o seguinte: rolos de algodão esterilizados; pinça estéril; tubo Falcon de 15 mL, estéril e devidamente etiquetado, contendo 1 ponta de micropipeta de 1000 µL; e arca frigorífica, para acondicionamento das amostras.

A *whole saliva* dos pacientes, não estimulada, foi recolhida segundo o protocolo preconizado no SalivaTec (Anexo II). De forma resumida, os pacientes tiveram que bochechar vigorosamente com água, durante 30 segundos e, depois de a cuspir, esperar 1 minuto sem engolir. Após colocação de 2 rolos de algodão estéreis sob a língua do dador (recolha sublingual), esperou-se 2 minutos e procedeu-se à recolha dos mesmos com uma pinça estéril, colocando-os num tubo de Falcon sobre a ponta da micropipeta. As recolhas eram realizadas na USF-Grão Vasco, foram colocadas imediatamente no frio (arca refrigeradora) de modo a minimizar a sua degradação.

Foi atribuído a cada amostra, à medida que iam sendo colhidas, um número de série, obtido através da aplicação Quartzzy (sistema para gestão laboratorial online).

2.6. Processamento e Armazenamento das Amostras

O processamento e o armazenamento das amostras foram realizados de acordo com o protocolo de controlo de qualidade de amostras estabelecido no SalivaTec. Brevemente, procedeu-se à centrifugação das amostras a 10.000 RCFs, durante 10 minutos, a 4°C para a remoção da saliva dos rolos de algodão e com a saliva obtida foi avaliado: volume total (usando uma micropipeta), a concentração de proteína (através do NanoVue™) e o pH.

De todas as amostras foram realizada alíquotas para armazenamento numa arca congeladora a -80°C, destinadas a posterior avaliação dos biomarcadores. Foram também estabelecidas alíquotas para deposição no Biobanco do Instituto de Medicina Molecular, visando a sua disponibilização para outros estudos.

2.7. Controlo de Qualidade das Amostras

O perfil de proteínas foi obtido por eletroforese capilar com recurso ao *Experion™ Automated Electrophoresis Station*, após a seleção das amostras com melhor caracterização clínica (dados do Questionário do Dador). O perfil obtido é utilizado para calcular as concentrações das proteínas identificadas nas diferentes amostras por comparação com padrões internos, como exemplificado na Figura 2.

Após se verificar se as amostras tinham o perfil de proteínas típico como critério para a avaliação de eventual degradação da amostra de saliva (critérios de inclusão em estudo segundo procedimento de rotina do

SalivaTec), procedeu-se à sua avaliação no tecnologia Multiplex dos biomarcadores selecionados.

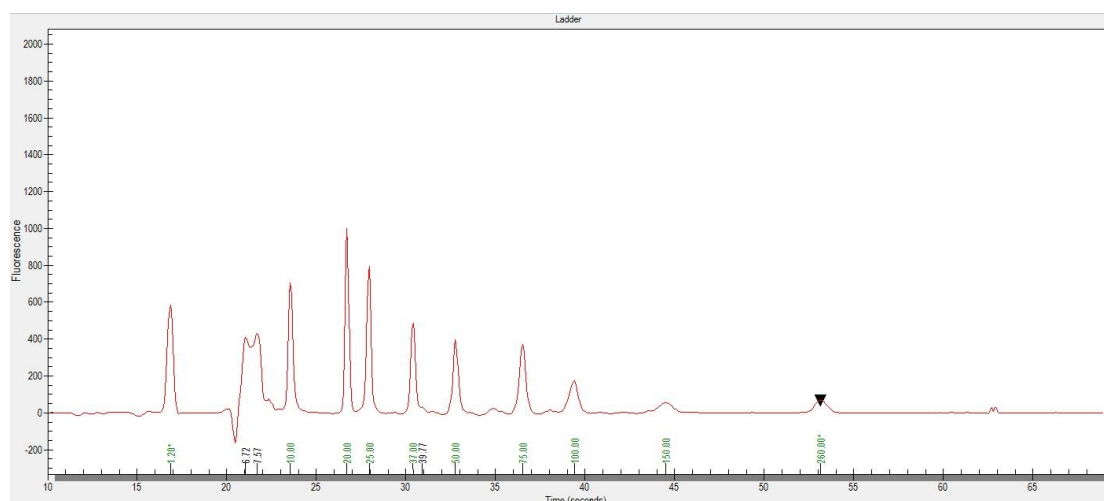


Figura 2 - Eletroferograma tipo, obtido com sistema Experion™ Automated Electrophoresis Station, associando o tempo de migração à fluorescência.

2.8. Quantificação dos Biomarcadores em saliva

A CCL3 e a CCL13, duas quimiocinas implicadas em atrair populações celulares distintas em processos inflamatórios, foram avaliadas através da tecnologia Multiplex (*Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader*), segundo instruções do fabricante, em amostras previamente selecionadas. Foram utilizados os kits Bio-Plex Pro™ Human Chemokine MIP-1 α /CCL3 Set #171-BK44MR2 e o Bio-Plex Pro™ Human Chemokine MCP-4/CCL13 Set #171-BK39MR2.

2.9. Análise Estatística

A informação demográfica e clínica relativa a cada amostra foi inserida numa base de dados, construída com o Microsoft® Excel® para Mac 2011 (Versão 14.4.9) (Figura 3). O mesmo software foi usado para organizar e

fazer a estatística descritiva dos resultados, juntamente com o GraphPad Prism.

A	B	C	D	E	F	G	H
Código Quartzzy	Sexo	Ano Nascimento	Patologias	Local recolha	Data recolha	Horas	Nº de Rolhões
I	J	K	L	M	N	O	P
Sublingual	Tempo de Recolha	Volume Total µL	[Proteína] µg/mL	pH	Código da Placa	Coordenadas	Mais observações

Figura 3 - Cabeçalho da base de dados no Microsoft® Excel® para Mac 2011, onde foram introduzidas as informações relativas às amostras.

Através da utilização do software GraphPad Prism, foram comparados os valores obtidos durante a observação clínica (CPO, IP e BOP), a caracterização das amostras e os valores obtidos na análise Multiplex (*Concentration in Range* para os Grupos DP e DP+DM e *Observed Concentration* para o Grupo de Controlo), para a CCL3 e para a CCL13. Para este fim foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Foi adotado em todas as análises estatísticas o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização demográfica e clínica dos grupos de estudo

O género, a idade e os parâmetros clínicos relativos às colheitas de saliva foram mensurados para um total de 64 indivíduos: 22 pacientes saudáveis (grupo Controlo), 14 pacientes com periodontite crónica (grupo DP) e 28 pacientes com periodontite crónica e Diabetes Mellitus tipo 2 (grupo DP+DM).

No presente estudo, foram observados mais indivíduos do sexo feminino no grupo dos Saudáveis (90,0%) do que no grupo da Periodontite (42,9%) e no grupo da Periodontite+Diabetes (32,1%), sendo o grupo DP o mais equilibrado entre géneros (Tabela 2).

No que diz respeito à idade, as médias entre os grupos de estudo também não foram semelhantes. A média do grupo Controlo foi inferior ($21\pm 3,3$ para o sexo feminino e $17\pm 2,1$ para o masculino) em relação à média do grupo DP ($48\pm 11,5$ para o sexo feminino e $55\pm 12,7$ para o masculino) e à do grupo DP+DM ($67\pm 11,8$ para o sexo feminino e $69\pm 10,8$ para o masculino). Apesar do grupo DP+DM se encontrar equilibrado, o mesmo não se pode dizer em relação aos restantes grupos de estudo, não existindo correspondência de idades entre géneros (Tabela 3).

A caracterização clínica oral (CPO, IP e BOP), realizada após a recolha de saliva, indicou que o grupo Controlo possuía menor nível de CPO ($2,682\pm 1,937$), menor índice de placa (IP) ($19,29\pm 15,81$) e menor sangramento à sondagem (BOP) ($6,870\pm 2,482$) relativamente ao grupo DP e ao grupo DP+DM, tal como esperado visto o grupo Controlo ser constituído por indivíduos mais jovens, havendo já uma melhor consciencialização para a higiene oral. Os três parâmetros clínicos foram estatisticamente significativos ($p < 0,0001$). O valor de CPO e de BOP foi maior no grupo DP e o valor de IP superior no grupo DP+DM (Tabela 4). Apesar do grupo DP ser constituído apenas por pacientes observados na Clínica Universitária, tendo supostamente a sua doença periodontal controlada, isso não é verificado pelo valor aumentado do BOP (indicador de inflamação). Este facto pode apontar

para que a periodontite crónica esteja ativa nestes pacientes. No que diz respeito ao valor aumentado da placa bacteriana (IP) nos pacientes periodontalmente comprometidos e com tipo 2 (não seguidos na Clínica Universitária), pode ser indicativo da falta de seguimento/ aconselhamento por parte do seu Médico Dentista.

Tabela 2 - Distribuição por género dos grupos de estudo

Grupos de Estudo	DISTRIBUIÇÃO POR GÉNERO				
	Feminino		Masculino		Total
	N	%	N	%	N
Saudáveis (Controlo)	20	90,9%	2	9,1%	22
Periodontite (DP)	6	42,9%	8	57,1%	14
Periodontite + Diabetes (DP+DM)	9	32,1%	19	67,9%	28

Tabela 3 - Distribuição por idade dos grupos de estudo

Grupos de Estudo	DISTRIBUIÇÃO POR IDADE (ANOS)			
	Feminino		Masculino	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Saudáveis (Controlo)	21	±3,3	17	±2,1
Periodontite (DP)	48	±11,5	55	±12,7
Periodontite + Diabetes (DP+DM)	67	±11,8	69	±10,8

Tabela 4 - Caracterização clínica dos grupos de estudo.

Parâmetros Clínicos	Grupo Controlo	Grupo DP	Grupo DP+DM	p
CPO	2,682±1,937	12,86±6,758	11,86±5,973	<0,0001*
IP (%)	19,29±15,81	61,89±35,37	76,24±34,40	<0,0001*
BOP (%)	6,870±2,482	20,20±15,20	17,73±10,11	<0,0001*

*p é estatisticamente significativo para o teste Kruskal-Wallis

3.2. Caracterização das amostras de saliva recolhidas

Foram processadas as recolhas de saliva dos 64 indivíduos incluídos no estudo, tendo sido avaliado o seu volume total, concentração proteína e pH.

No que concerne ao volume total de saliva, em μL , as médias entre os grupos variaram significativamente ($p < 0,0001$), tendo o maior volume sido encontrado no grupo de controlo. As comparações feitas entre o grupo Controlo e o grupo DP e entre o grupo DP e o grupo DP+DM indicam que não existe significância estatística (p ajustado=0,5179 e p ajustado=0,0666, respetivamente) no entanto, entre o grupo Controlo e o grupo DP+DM os valores obtidos revelaram-se muito significativos (p ajustado $< 0,0001$) (Figura 4A). Os baixos valores obtidos, em relação aos outros grupos, em pacientes com periodontite e diabetes vão de encontro ao descrito na literatura, que indica a existência de alterações no fluxo e na bioquímica salivar, como por exemplo a sialose diabética, na Diabetes Mellitus tipo 2 (81–83).

A variação das médias das concentrações de proteína, em $\mu\text{g/mL}$, obtida nos diferentes grupos de estudo não foi estatisticamente significativo ($p=0,2911$). No entanto os grupos DP e DP+DM apresentaram maiores concentrações de proteína na saliva que o grupo de controlo (Figura 4B). Quando comparados o grupo Controlo e o grupo DP, o valor de p ajustado foi 0,9999; na comparação entre o grupo Controlo e o grupo DP+DM o valor de p ajustado foi 0,3486; e comparando o grupo DP com o grupo DP+DM o valor de p ajustado foi 0,9999. Esta informação confirma o apresentado no estudo de Kejrival *et al.* (84), onde os resultados revelaram maiores níveis de concentração de proteína em pacientes com periodontite crónica quando comparados a indivíduos saudáveis, tendo os seus resultados sido estatisticamente significativos. O aumento foi explicado com base no processo inflamatório, que aumenta a síntese e secreção de algumas proteínas. Segundo Henskens *et al.*, o aumento dos níveis pode, em parte, ser também devido a um aumento da libertação de proteínas plasmáticas na saliva devido à inflamação (85).

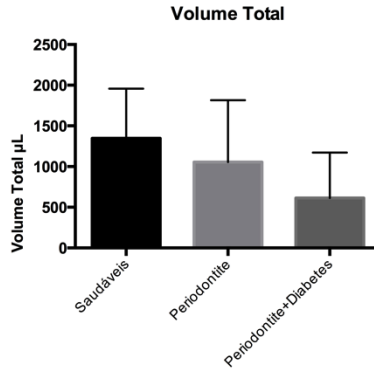
Relativamente ao valor de pH obtido das amostras de saliva, por grupo de estudo, as suas médias variam significativamente ($p=0,0013$). Apesar de não existir significância quando se compara o grupo Controlo com o grupo DP (p ajustado=0,0783), nem quando se compara o grupo DP com o grupo DP+DM (p ajustado $> 0,9999$), o mesmo não é verificado quando comparados o grupo Controlo com o grupo DP+DM (p ajustado=0,001) (Figura 4C). Segundo o estado da arte, o pH na cavidade oral é mantido próximo da

neutralidade (6,7-7,3) pela saliva, sendo: =7,0 quando existe saúde, tanto a nível dentário como periodontal; <7,0, quando a saliva se encontra ácida, e existindo uma condição crónica, a boca é mais suscetível à cárie, mau hálito e periodontite; >7,0 em situações de alcalinidade (86). Com o aprofundamento do sulco gengival, os fatores ambientais nos locais subgengivais tornam-se mais estáveis, sob estas condições, são encontradas bactérias assacarolíticas e anaeróbias e/ou proteolíticas como *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Prevotella* e *Porphyromonas*. Este microbiota subgengival, responsável pela periodontite crónica, utiliza/cria produtos finais que são ligeira a moderadamente ácidos na natureza, fazendo com que o pH seja <7 (86). No estudo de Shaila *et al.* (87), a média entre os grupos de estudo também se encontrava abaixo de 7 (Controlo 6,66±0,439, DP 6,53±0,406). Estes valores não vão de encontro aos obtidos no presente estudo (Tabela 5), onde, para os três grupos, a média de pH foi superior a 7 (Controlo 7,48±0,290, DP 7,15±0,542 e DP+DM 7,08±0,350).

3.3. Quantificação dos Biomarcadores

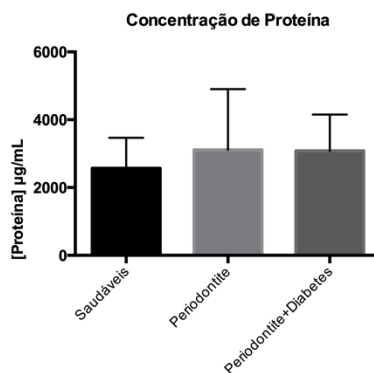
Por motivos de controlo de recursos económicos foram analisadas apenas 32 amostras das recolhidas, tendo sido determinado o perfil total de proteínas por recurso ao *Experion™ Automated Electrophoresis Station*: 11 amostras do grupo dos Saudáveis (Controlo), 11 amostras do grupo da Periodontite (DP), 10 amostras do grupo da Periodontite + Diabetes Mellitus tipo 2 (DP+DM). Como todas cumpriam os critérios de qualidade do SalivaTec, passaram para a quantificação dos biomarcadores por tecnologia Multiplex.

A



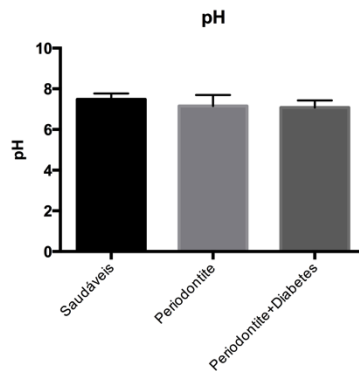
VOLUME TOTAL					
Teste de Kruskal-Wallis		Testes de Comparações Múltiplas de Dunn	Significante?	Sumário	p Ajustado
Valor de p	< 0,0001	Saudáveis vs. Periodontite	Não	SS	0,5179
Sumário	****	Saudáveis vs. Periodontite+Diabetes	Sim	****	< 0,0001
Médias variam significativamente?	Sim	Periodontite vs. Periodontite+Diabetes	Não	SS	0,0666

B



CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA					
Teste de Kruskal-Wallis		Testes de Comparações Múltiplas de Dunn	Significante?	Sumário	p Ajustado
Valor de p	0,2911	Saudáveis vs. Periodontite	Não	SS	0,9999
Sumário	SS	Saudáveis vs. Periodontite+Diabetes	Não	SS	0,3486
Médias variam significativamente?	Não	Periodontite vs. Periodontite+Diabetes	Não	SS	0,9999

C



pH					
Teste de Kruskal-Wallis		Testes de Comparações Múltiplas de Dunn	Significante?	Sumário	p Ajustado
Valor de p	0,0013	Saudáveis vs. Periodontite	Não	SS	0,0783
Sumário	**	Saudáveis vs. Periodontite+Diabetes	Sim	**	0,001
Médias variam significativamente?	Sim	Periodontite vs. Periodontite+Diabetes	Não	SS	>0,9999

SS - Sem significado estatístico

Figura 4 - Caracterização das amostras recolhidas, por grupo de estudo, e análise estatística dos resultados. A- Volume total; B- Concentração de proteína; C- pH.

Tabela 5 - Análise dos valores mínimos e máximos, média e desvio padrão de pH obtidos por grupo de estudo.

pH								
Grupo Controlo			Grupo DP			Grupo DP+DM		
Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média
6,78	7,87	7,48±0,290	6,32	8,00	7,15±0,542	6,38	7,82	7,08±0,350

Da análise no *Experion™ Automated Electrophoresis Station*, obtiveram-se perfis onde foi possível observar as diferenças no número de proteínas e também de concentração existente entre algumas das proteínas que compõem o perfil de proteínas salivares presentes em cada grupo de estudo. Na Figura 5 encontram-se representadas três amostras correspondentes a cada um dos grupos de estudo.

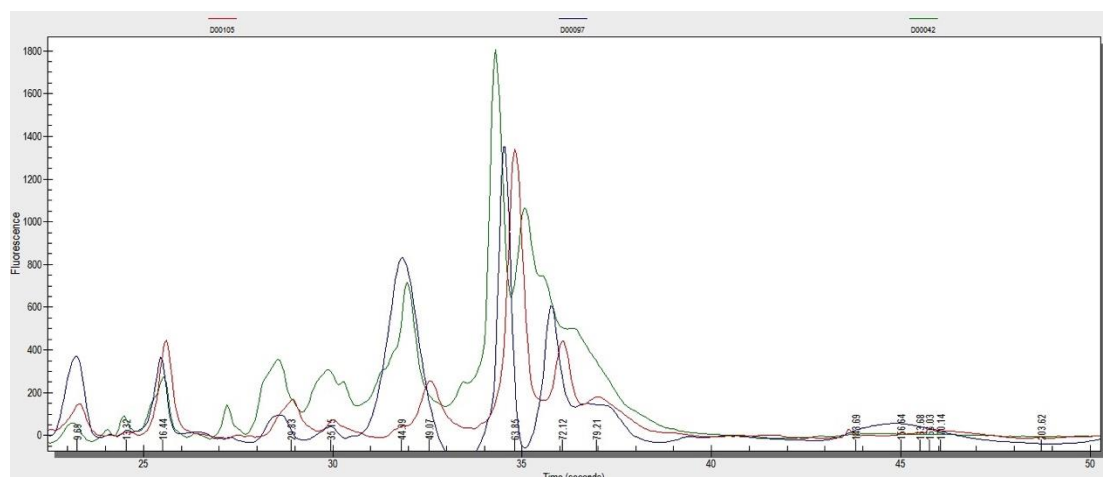


Figura 5 - Eletroferograma. Perfil de proteínas das amostras pertencentes aos grupos de estudo, obtido no *Experion™ Automated Electrophoresis Station*. O perfil a vermelho corresponde a uma amostra do grupo Controlo; a azul ao grupo DP; a verde ao grupo DP+DM. Os valores acima do eixo dos X são correspondentes ao peso molecular.

Cada pico encontrado no eletroferograma (Figura 5) corresponde a 1 proteína ou conjunto de proteínas com pesos moleculares muito próximos (kDa) cuja fluorescência permite determinar a concentração de proteína presente em cada pico, por comparação com padrões internos de concentração (Tabela 6). Os perfis de proteínas obtidos relativos ao grupo de Controlo (a vermelho), ao grupo DP (a azul) e ao grupo DP+DM (a verde) são distintos indicando que existirão proteínas que estão a ser diferentemente expressas na saliva nestas diferentes situações de doença.

Estudos anteriores por espectrometria de massa (resultados em fase de publicação) mostraram as potenciais proteínas correspondentes aos diferentes pesos moleculares (Tabela 6). As possíveis proteínas que podem estar nas mesmas amostras apresentadas na Figura 5 são: *Acyl-CoA-binding protein* (P07108)(10kDa); *Protein S100-A9 (Calgranulin-B)* (P06702)(13kDa); *Cystatin-SA (Cystatin-2)* (P09228)(16 kDa); *Cystatin-SN (Cystatin-SA-I)* (P01037)(16 kDa); *Cystatin-S (Cystatin-4)* (P01036)(16 kDa); *Cystatin-C (Cystatin-3)* (P01034)(16 kDa); *14-3-3 protein sigma* (P31947)(28 kDa); *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (P25311)(34 kDa); *Carbonic anhydrase 6* (P23280) (35 kDa); *Ig gamma-1 chain C region* (P01857)(36 kDa); *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (P04406)(36 kDa); *Ig mu chain C region* (P01871)(49 kDa); *BPI fold-containing family B member 2* (Q8N4F0)(49 kDa); *Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E* (Q08188)(77 kDa).

Os resultados de quantificação dos biomarcadores obtidos por anticorpos específicos com recurso a tecnologia Multiplex mostraram que no grupo da Periodontite, apenas uma amostra teve valores quantificáveis para a CCL3 (38,28 pg/mL) e duas para a CCL13 (15,02 e 31,76 pg/mL). No que diz respeito ao grupo da Periodontite+Diabetes, não existiu nenhuma amostra com concentração passível de ser detetada. As médias encontradas entre os 3 grupos de estudo, tanto para a CCL3 como para a CCL13 variaram significativamente ($p=0,0289$ e $p=0,0273$, respetivamente). Na Figura 6 encontram-se as concentrações das amostras de saliva recolhidas bem como as médias e desvios padrão para a quantificação de cada quimiocina.

Segundo um estudo realizado por Khan (88), a CCL3 não foi detetada na saliva de pacientes saudáveis (nem na urina nem no plasma), independentemente do género. Al-Sabbagh *et al.* (89), quando avaliou na saliva a associação entre a CCL3 e a remodelação óssea, observou que esta quimiocina se encontrava sobre-regulada (18x) em pacientes com periodontite, relativamente aos saudáveis. Duarte *et al.* (31), descobriu que no fluido crevicular de pacientes diabéticos a concentração de CCL3 er

Tabela 6 – Relação entre os pesos moleculares obtidos para as amostras dos diferentes grupos de estudos, proteínas com correspondência a esse peso e patologias onde essas proteínas podem estar presentes, com a regulação conhecida para essas. WS – *whole saliva*; FC – fluido crevicular. Fonte: OralCard.

Pesos moleculares das Amostras (kDa)			Possível(eis) proteína(s) correspondente(s)	Patologias Associadas		
Controlo (linha vermelha)	DP (linha azul)	DP+DM (linha verde)	Nome	Código UniProt	Periodontite Crônica	Diabetes Mellitus
		9,43	-	-		
9,69	9,57		Acyl-CoA-binding protein	P07108	x1,03 WS; x3,06 FC	WS
	11,81	11,63	-	-		
13,32	13,16	12,98	Protein S100-A9 (Calgranulin-B)	P06702	x1,63 WS; x16,27 FC	WS
16,44	16,00	16,29	Cystatin-SA (Cystatin-2)	P09228	x-1,09 WS; x1,80 FC	x
			Cystatin-SN (Cystatin-SA-I)	P01037	x-0,13 WS; x-2,82 FC	x-4,27 WS
			Cystatin-S (Cystatin-4)	P01036	x-0,1 WS	x-2,44 WS
			Cystatin-C (Cystatin-3)	P01034	x-1,30 WS	x2,20 WS
	19,15		-	-		
		22	-	-		
	28,2	27,87	14-3-3 protein sigma	P31947	x-1,03 WS; x2,04 FC	WS
29,83			-	-		
		34,34	Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311	x-1,24 WS; x-8,5 FC	x-1,56 WS
35,15	34,68		Carbonic anhydrase 6	P23280	x1,71 WS; FC	x3,80 WS
		36,42	Ig gamma-1 chain C region Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P01857 P04406	x1,10 WS; x2,00 FC x1,15 WS; FC	x1,52 WS WS
44,99	44,82		-	-		
		45,74	-	-		
49,07			Ig mu chain C region	P01871	x-1,30 WS; FC	x
			BPI fold-containing family B member 2	Q8N4F0	x-1,80 WS; FC	x
		54,71	-	-		
		60,17	-	-		
	61,7		-	-		

Pesos moleculares das Amostras (kDa)			Possível(eis) proteína(s) correspondente(s)	Patologias Associadas		
Controlo (linha vermelha)	DP (linha azul)	DP+DM (linha verde)	Nome	Código UniProt	Periodontite Crónica	Diabetes Mellitus
		65,73	-	-		
	70,19		-	-		
72,12			-	-		
		73,98	-	-		
	76,92		Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	Q08188	x1,30 WS; x3,46 FC	WS
79,21			-	-		
143,69			-	-		
156,64			-	-		
163,68			-	-		
166,03			-	-		
170,14			-	-		
203,62			-	-		

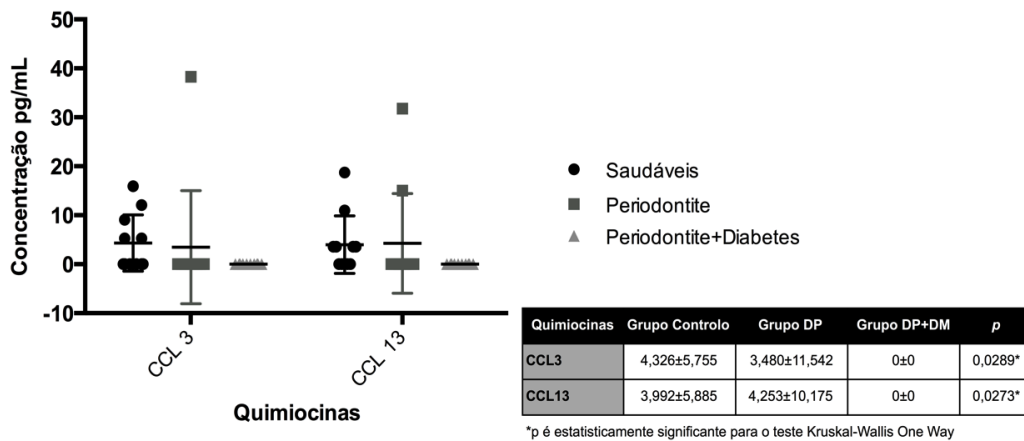
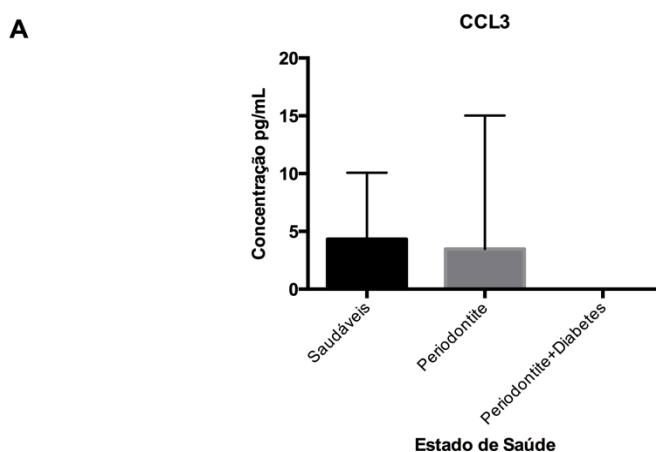


Figura 6 - Média da concentração da CCL3 e da CCL13, para cada grupo de estudo.

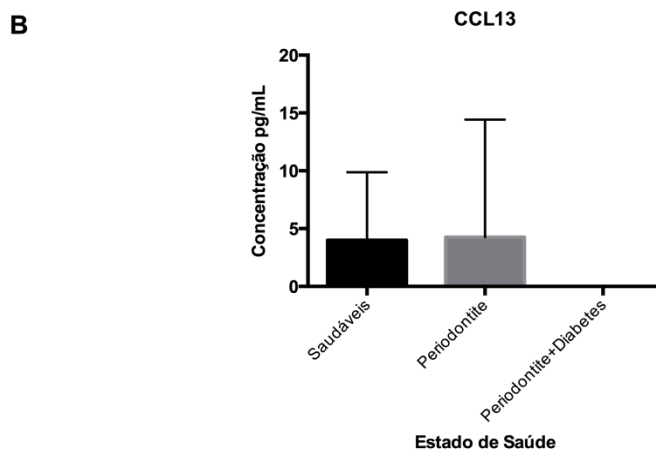
maior do que no dos saudáveis, independentemente do local de recolha estar ou não periodontalmente comprometido ($98,0 \pm 66,1$ e $107,7 \pm 32,7$ pg/mL, respetivamente). No grupo dos saudáveis a concentração desta proteína era maior quando os pacientes sofriam de periodontite. Porém os resultados obtidos no presente estudo não vão de encontro ao sugerido pelos autores supracitados, uma vez que a CCL3 foi detetada na saliva dos pacientes do grupo de Controlo, tendo também sido observada, embora em menor concentração, no grupo DP. Nas amostras de saliva do grupo da Periodontite+Diabetes, a CCL3 não foi detetada em nenhuma (Figura 6). Quando comparados o grupo Controlo com o grupo DP e o grupo DP com o grupo DP+DM verificou-se que não existia significância (p ajustado=0,1468 e p ajustado>0,9999, respetivamente) no entanto, quando comparados o grupo Controlo com o grupo DP+DM, o valor de p foi significativo (p ajustado=0,0348) (Figura 7A).

Relativamente à CCL13, esta também não foi detetada no grupo DP+DM, no entanto foi detetada em maior concentração no grupo DP do que no grupo Controlo (Figura 6). No presente estudo, nas comparações entre o grupo Controlo com o grupo DP e o grupo DP com o grupo DP+DM, não existe significância (p ajustado=0,3181 e p ajustado=0,8395, respetivamente) mas, entre o grupo Controlo com o grupo DP+DM, o valor de p foi significativo (p ajustado=0,0236) (Figura 7B). Rosa *et al.* (16) descreve que esta quimiocina foi encontrada no fluído crevicular, encontrando-se sobre-

regulada (4,97x) na periodontite crónica e podendo ser considerada um biomarcador salivar exclusivo desta patologia. Pradeep *et al.* (33), concluiu que esta quimiocina pode vir a ser um marcador inflamatório que liga a obesidade (principal fator de risco para a DMT2) à doença periodontal, tendo observado que os valores da CCL13 eram superiores em pacientes comprometidos periodontalmente e em pacientes obesos, o que não vai de encontro aos resultados do presente estudo.



CCL3					
Teste de Kruskal-Wallis		Testes de Comparações Múltiplas de Dunn	Significante?	Sumário	<i>p</i> Ajustado
Valor de <i>p</i>	0,0289	Saudáveis vs. Periodontite	Não	SS	0,1468
Sumário	*	Saudáveis vs. Periodontite+Diabetes	Sim	*	0,0348
Médias variam significativamente?	Sim	Periodontite vs. Periodontite+Diabetes	Não	SS	>0,9999



CCL13					
Teste de Kruskal-Wallis		Testes de Comparações Múltiplas de Dunn	Significante?	Sumário	<i>p</i> Ajustado
Valor de <i>p</i>	0,0273	Saudáveis vs. Periodontite	Não	SS	0,3181
Sumário	*	Saudáveis vs. Periodontite+Diabetes	Sim	*	0,0236
Médias variam significativamente?	Sim	Periodontite vs. Periodontite+Diabetes	Não	SS	0,8395

SS - Sem significado estatístico

Figura 7 - Relação entre grupos de estudo relativamente à concentração de quimiocinas observada no Multiplex. A - CCL3; B - CCL13.

No presente trabalho a quantificação das quimiocinas CCL3 e CCL 13 tinha por objetivo por uma lado verificar se estes biomarcadores já propostos por outros autores se mantinham válidos em pacientes multi-comprometidos, adicionalmente pretendíamos obter evidências sobre se a existência de sub-populações de macrófagos e de Th na doença periodontal e em pacientes multi-comprometidos com DMT2.

Está descrito para outras doenças inflamatórias crônicas (como artrite reumatóide), a existência dos diferentes subtipos de macrófagos e de células *Helper*. No entanto, para a doença periodontal, não existe ainda suporte para a sua existência. Os dados de quantificação de citocinas e quimiocinas identificadas em diversas patologias e que se encontram depositados no OralCard são úteis para elucidar a presença das células acima referidas, mais especificamente, eventuais subtipos de macrófagos envolvidos na produção das quimiocinas CCL3 e CCL13.

Considerado um componente essencial da imunidade inata, os macrófagos podem adquirir fenótipos funcionais distintos através de diferentes polarizações fenotípicas (90). No esquema abaixo (Figura 8), é possível observar quatro tipos de macrófagos, associados a diversos tipos da resposta imunológica:

- O macrófago 1 clássico (M1 Clássico), é polarizado na presença de citocinas pro-inflamatórias e produtos microbianos (IFN- γ e dos LPS dos patógenos periodontais) e, após essa polarização, expressa IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-15 e IL-23 e CXCL8 e CCL13 (citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias). A IL-12 polariza as Th1 e faz com que estas expressem TNF- α e IFN- γ . Assim, estes macrófagos são caracterizados por um fenótipo pro-inflamatório e por uma forte atividade microbicida e tumoricida (90–93);
- A propósito dos macrófagos 2a (M2a), estes são polarizados por interleucinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-13), o que conduz à expressão de citocinas (IL-10 e TGF- β), consideradas anti-diferenciação das Th2, levando à expressão das interleucinas 5, 9, 10 e 13. Este tipo de resposta imunológica está relacionado com as alergias (90–93);

- No que concerne aos macrófagos 2b (M2b), eles são polarizados pela IL-1 α e pela IL-1 β mais os LPS dos microrganismos, e expressam citocinas, como a IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 (todas pro-inflamatórias à exceção da IL-10 que é anti-inflamatória), e quimiocinas, como a CCL2 e CCL3. Tanto as citocinas como as quimiocinas vão conduzir à expressão de células B (91);
- A IL-10 polariza o M2c (macrófago 2c), e este por sua vez vai expressar citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β) e quimiocinas (CCL3). A IL-10 e o TGF- β contribuem para a diferenciação do Treg, que expressam IL-9, IL-10 e TGF- β . Estes processos estão relacionados com a deposição da matriz e com a remodelação tecidual (imunoregulação) (91).

Os resultados obtidos neste estudo apesar de revelarem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo saudável e o grupo DP+DM não suportam estas observações dado que não foi detetada a presença nem de CCL3 nem de CCL13 neste último grupo. Segundo a informação depositada no OralCard para a doença periodontal (periodontite crónica), pensa-se que os macrófagos que estarão envolvidos na inflamação desta doença periodontal, pela produção de citocinas pro-inflamatórias e por serem polarizados pelos LPS dos microrganismos, sejam os M1 Clássicos e os M2b.

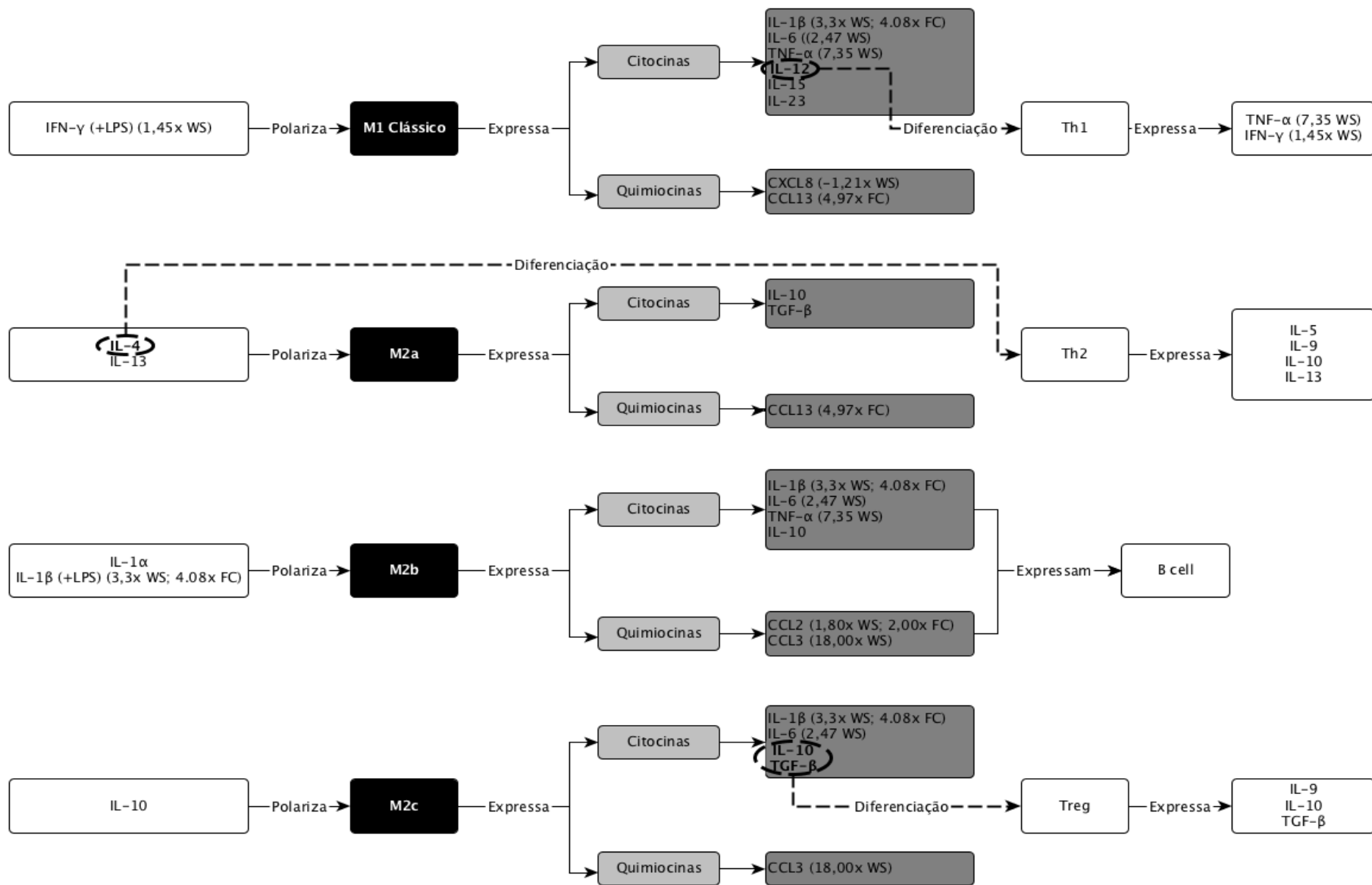


Figura 8 - Quadro resumo das vias de polarização e expressão dos vários tipos de macrófagos com a quantificação das citocinas/quimiocinas existente no OralCard para a periodontite crônica. WS – whole saliva; FC – fluido crevicular. Fonte: OralCard.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho evidenciou que existem diferenças em termos do perfil e da quantidade de cada proteína presente em amostras de saliva em pacientes com periodontite e em pacientes multi-comprometidos.

Os resultados preliminares obtidos com o presente trabalho fazem parecer, pelas diferentes quantificações da CCL3 e da CCL13, que existem fenómenos distintos entre pacientes saudáveis e pacientes multi-comprometidos, com periodontite crónica e diabetes tipo 2 bem como evidenciam a provável presença das sub-populações de macrófagos nomeadamente M1 e M2b. São no entanto necessários mais estudos, principalmente com amostras maiores e com correspondência entre os sexos e idades entre os grupos de estudo para ser estabelecida uma quantificação comparável das 2 quimiocinas. A verificar-se que estas 2 quimiocinas estão presentes em quantidades alteradas de forma diferenciada em pacientes com periodontite crónica face aos com periodontite crónica e diabetes, pode ser esclarecida que sub-populações de macrófagos e de Th estão presentes nas situações descritas e poderão ser encontradas as razões para a manutenção do processo de inflamação crónica.

Na sequência desta pesquisa seria importante realizar a quantificação pela tecnologia Multiplex das moléculas envolvidas na regulação das Th17, nomeadamente citocinas e quimiocinas. A presença deste subtipo de linfócitos e a sua quantificação, ajudaria a esclarecer a persistência da periodontite, através do tipo de resposta imune presente na mesma. Uma vez que as amostras de saliva recolhidas se encontram depositadas no Biobanco do Instituto de Medicina Molecular, estas poderão ser utilizadas para avaliar a presença das Th17 (através do kit Bio-Plex Pro™ Human Th17 Cytokine Assays) em estudos posteriores, no sentido de esclarecer o papel das Th17 em pacientes multi-comprometidos.

Assim, o presente estudo deixa pendente algumas questões a responder em próximos estudos:

- 1) Será a periodontite realmente uma patologia oral crónica com ausência de resposta imune adquirida?

2) Na periodontite existirão apenas mecanismos celulares e moleculares da resposta inata, sendo o processo crônico caracterizado por ocorrência de picos de inflamação aguda?

5. BIBLIOGRAFIA

1. Pesquita C, Faria D, Falcão AO, Lord P, Couto FM. Semantic similarity in biomedical ontologies. *PLoS computational biology*. 2009 Jul 31;5(7):e1000443.
2. Chang P-C, Lim LP. Interrelationships of periodontitis and diabetes: A review of the current literature. *Journal of Dental Sciences*. 2012;7(3):272–82.
3. Adams DA, Barrington EP, Caton J, Genco RJ, Goodman SF, Hildebrand CN, et al. Parameters of Care Supplement. *Journal of Periodontology*. 2000;71(5):847–83.
4. Herring ME, Shah SK. Periodontal disease and control of diabetes mellitus. *The Journal of the American Osteopathic Association*. 2006;106(7):416–21.
5. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nature reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2011 Dec;7(12):738–48.
6. Braga S, Braga D, Soares S. Diabetes Mellitus e Periodontite – um Caso de Saúde Oral. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. Elsevier; 2009 Apr;50(2):111–7.
7. Bostanci N, Bao K, Wahlander A, Grosmann J, Thurnheer T, Belibasakis GN. Secretome of gingival epithelium in response to subgingival biofilms. *Molecular Oral Microbiology*. 2015;n/a – n/a.
8. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The Keystone Pathogen Hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(10):717–25.
9. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *The Journal of Periodontology*. 2005;76(December):2187–93.
10. Taylor JJ. Protein biomarkers of periodontitis in saliva. *International Scholarly Research Notices*. 2014;2014.

11. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2007 Jul;78(7 Suppl):1387–99.
12. Armitage GC. Diagnosis of periodontal diseases. *Journal of Periodontology*. 2003 Aug 1;74(8):1237–47.
13. Armitage GC. Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1995 Feb;7(1):39–53.
14. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2004;34:9–21.
15. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*. 1999;4(1):1–6.
16. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Costa N, Oliveira JL, Barros M. The landscape of protein biomarkers proposed for periodontal disease: markers with functional meaning. *BioMed Research International*. 2014 Jan;2014:569632.
17. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013;2013.
18. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2013;15(August):e7.
19. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2014;64(1):57–80.
20. Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2014;4:256–61.
21. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DT., et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2014;13(12):1174–81.
22. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*. 2014 Jan;35(1):3–11.

23. Racz GZ, Kadar K, Foldes A, Kallo K, Perczel-Kovach K, Keremi B, et al. Immunomodulatory and Potential Therapeutic Role of Mesenchymal Stem Cells in Periodontitis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2014;65(3):327–39.
24. Navarrete M, García J, Dutzan N, Henríquez L, Puente J, Carvajal P, et al. Interferon- γ , interleukins-6 and -4, and factor XIII-A as indirect markers of the classical and alternative macrophage activation pathways in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2014 May;85(5):751–60.
25. Garlanda C, Dinarello C a., Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. Elsevier Inc.; 2013;39(6):1003–18.
26. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V.; 2014;1842(3):446–62.
27. Kobayashi T, Yoshie H. Host Responses in the Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis. *Current Oral Health Reports*. 2014;2(1):1–8.
28. Longo PL, Artese HPC, Rabelo MS, Kawamoto D, Foz AM, Romito GA, et al. Serum levels of inflammatory markers in type 2 diabetes patients with chronic periodontitis. *Journal of Applied Oral Science*. 2014;22(2):103–8.
29. Gümüş P, Nizam N, Lappin DF, Buduneli N. Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- α in patients with periodontitis. *Journal of periodontology*. 2014;85(2):270–80.
30. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. *PloS one*. 2013 Jan;8(4):e61356.
31. Duarte PM, Bezerra JP, Miranda TS, Feres M, Chambrone L, Shaddox LM. Local levels of inflammatory mediators in uncontrolled type 2 diabetic subjects with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2014 Jan;41(1):11–8.

32. Sahingur SE, Yeudall WA. Chemokine Function in Periodontal Disease and Oral Cavity Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2015;6(May):1–15.
33. Pradeep AR, Kumari M, Kalra N, Priyanka N. Correlation of MCP-4 and high-sensitivity C-reactive protein as a marker of inflammation in obesity and chronic periodontitis. *Cytokine*. 2013;61(3):772–7.
34. Ardila CM, Guzmán IC. Comparison of serum amyloid A protein and C-reactive protein levels as inflammatory markers in periodontitis. *Journal of Periodontal & Implant Science*. 2015;45:14–22.
35. Bansal T, Pandey A, D D, Asthana AK. C-Reactive Protein (CRP) and its Association with Periodontal Disease: A Brief Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014;8(7):21–4.
36. Kim J-B, Jung M-H, Cho J-Y, Park J-W, Suh J-Y, Lee J-M. The influence of type 2 diabetes mellitus on the expression of inflammatory mediators and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in human chronic periodontitis. *Journal of Periodontal & Implant Science*. 2011 Jun;41(3):109–16.
37. Kumari M, Pradeep A, Priyanka N, Kalra N, Naik SB. Crevicular and serum levels of monocyte chemoattractant protein-4 and high-sensitivity C-reactive protein in periodontal health and disease. *Archives of Oral Biology*. Elsevier Ltd; 2014;59(6):645–53.
38. Şurlin P, Oprea B, Solomon SM, Popa S-G, Mota M, Mateescu GO, et al. Matrix metalloproteinase -7,-8,-9 e -13 in gingival tissue of patients with type 1 diabetes and periodontitis. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*. 2014;55:1137–41.
39. Aspriello SD, Zizzi A, Tirabassi G, Buldreghini E, Biscotti T, Faloia E, et al. Diabetes mellitus-associated periodontitis: differences between type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Periodontal Research*. 2011 Apr;46(2):164–9.
40. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014;105(2):141–50.

41. World Health Organization. Diabetes [Internet]. Fact sheet no. 312. World Health Organization; 2015 [cited 2015 Jan 14]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
42. Correia LG, Boavida JM, Almeida JPF de, Cardoso SM, Dorés J, Duarte JS, et al. Diabetes: Factos e Números 2014 - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes. Sociedade Portuguesa de Diabetologia. 2014;64.
43. Bascones-Martínez A, González-Febles J, Sanz-Esporrín J. Diabetes and periodontal disease. Review of the literature. American Journal of Dentistry. 2014;27(2):63–7.
44. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2012 Jan;35(Supplement 1):S64–71.
45. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2015. Diabetes Care. 2015;38(1):S1–94.
46. Cornell S. Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. Therapeutics and clinical risk management. 2015;11:621–32.
47. Pinheiro A. Pé de Charcot: Uma visão actual da neuroartropatia de Charcot. Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia. Sociedade Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia; 2014;22(1):24–33.
48. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. World Journal of Diabetes. 2015;6(3):456.
49. Ealey BRM. Diabetes Mellitus. Principles of Medicine. 2010. p. 563–77.
50. S. Cotran; Ramzi, Kumar, Vinay, Collins, Tucker. Robbins Pathologic basis of disease. 6th Editio. Saunders; p. 914:925.
51. Lou M, Luo P, Tang R, Peng Y, Yu S, Huang W, et al. Relationship between neutrophil-lymphocyte ratio and insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients. BMC Endocrine Disorders. 2015;15(1):4–9.
52. Preshaw PM. Periodontal disease and diabetes. Journal of Dentistry. 2009 Aug;37(8):S575–7.
53. Ship JA. Diabetes and oral health. The Journal of the American Dental Association. 2003 Oct 10;134:4S – 10S.

54. Vernillo AT. Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. *The Journal of the American Dental Association*. 2003 Oct 10;134:24S – 33S.
55. Silness J, Løe H. Periodontal Disease in Pregnancy II. Correlation Between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica*. Informa UK Ltd UK; 1964 Jul 2;22:121–35.
56. Zhou X, Zhang W, Liu X, Zhang W, Li Y. Interrelationship between diabetes and periodontitis: Role of hyperlipidemia. *Archives of Oral Biology*. Elsevier Ltd; 2015;60(4):667–74.
57. Ritchie CS. Mechanistic links between type 2 diabetes and periodontitis. *Journal of Dentistry*. 2009 Aug;37(8):S578–9.
58. Jakuš V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiological Research*. 2004;53(2):131–42.
59. Bascones-Martínez A, González-Febles J, Sanz-Esporrín J. Diabetes and periodontal disease. Review of the literature. *American Journal of Dentistry*. 2014;27(2):63–7.
60. Esteves MC, Gonçalves ANAM, Caldeira JL. Glicosilação Avançada na Diabetes Mellitus - Génese das Complicações Tardias. *Acta Médica Portuguesa*. 2001;14:409–12.
61. Chapple ILC, Genco R. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013 Apr;40(1):S106–12.
62. Alves C, Andion J, Brandão M, Menezes R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. ABE&M; 2007 Oct;51(7):1050–7.
63. Arrais JP, Rosa N, Melo J, Coelho ED, Amaral D, Correia MJ, et al. OralCard: A bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Archives of Oral Biology*. 2013;58:762–72.
64. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Lopes P, Melo J, Oliveira JL, et al. From the salivary proteome to the OralOme: Comprehensive molecular oral biology. *Archives of Oral Biology*. 2012;57(7):853–64.

65. Mittal S, Bansal V, Garg S, Atreja G, Bansal S. The diagnostic role of saliva - A Review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2011;3(4):e314–20.
66. Scarano E, Fiorita A, Picciotti PM, Passali GC, Calò L, Cabras T, et al. Proteomics of saliva: personal experience. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. Pacini Editore; 2010 Jun 1;30(3):125–30.
67. Moura SAB de, Medeiros AMC de, Costa FRH de, Moraes PH de, Oliveira Filho SA de. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2007;7(2):187–94.
68. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clinical Chemistry*. 2011 May;57(5):675–87.
69. Baum BJ, Yates JR, Srivastava S, Wong DTW, Melvin JE. Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. *Advances in Dental Research*. 2011 Oct;23(4):360–8.
70. Gopal S, Gopal S, Raheema M, Narayani S, Kumar H. Salivary biomarkers in periodontal diagnosis: current concepts and future trends. *Archives of Dentistry*. 2015;1(1):7–18.
71. Patil PB, Patil BR. Saliva: A diagnostic biomarker of periodontal diseases. *Journal of Indian Society of Periodontology*. Medknow Publications; 2011 Oct;15(4):310–7.
72. Mi Q, Li NY-K, Ziraldo C, Ghuma A, Mikheev M, Squires R, et al. Translational systems biology of inflammation: potential applications to personalized medicine. *Personalized Medicine*. Future Medicine Ltd London, UK; 2010 Sep 1;7(5):549–59.
73. Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2013 Jan 16;415:261–5.
74. Chan HH, Rahim ZHA, Jessie K, Hashim OH, Taiyeb-Ali TB. Salivary proteins associated with periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Science*. Molecular Diversity Preservation International; 2012 Jan 12;13(4):4642–54.

75. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *The Journal of Periodontology*. 2006;77(11):1863–70.
76. Kardeşler L, Buduneli N, Çetinkalp S, Lappin D, Kinane DF. Gingival crevicular fluid IL-6, tPA, PAI-2, albumin levels following initial periodontal treatment in chronic periodontitis patients with or without type 2 diabetes. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society*. 2011 Feb;60(2):143–51.
77. Morelli T, Stella M, Barros SP, Marchesan JT, Moss KL, Kim SJ, et al. Salivary Biomarkers in a Biofilm Overgrowth Model. *Journal of Periodontology*. 2014;85(12):1770–8.
78. Hill EG, Slate EH, Wiegand RE, Grossi SG, Salinas CF. Study design for calibration of clinical examiners measuring periodontal parameters. *Journal of Periodontology*. 2006 Jul;77(7):1129–41.
79. Osborn J, Stoltenberg J, Huso B, Aeppli D, Pihlstrom B. Comparison of measurement variability in subjects with moderate periodontitis using a conventional and constant force periodontal probe. *Journal of Periodontology*. 1992;63:282–9.
80. Klein H, Palmer CE. Studies on Dental Caries. *Public Health Reports*. 1938 Sep 23;53(38):1685–732.
81. Carda C, Mosquera-Lloreda N. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Oral Medicine and Pathology*. 2006;11:309–14.
82. Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2010;2:3.
83. Bajaj S, Gupta A, Prasad S, Singh V. Oral manifestations in type-2 diabetes and related complications. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2012;16(5):777–9.
84. Kejriwal S, Bhandary R, Thomas B, Kumari S. Estimation of levels of salivary mucin, amylase and total protein in gingivitis and chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014 Oct;8(10):ZC56–60.

85. Henskens YMC, Velden U, Veerman ECI, Amerongen AVN. Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis periodonitis. *Journal of Periodontal Research*. 1993 Jan;28(1):43–8.
86. Baliga S, Muglikar S, Kale R. Salivary pH: A diagnostic biomarker. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013 Jul;17(4):461–5.
87. Shaila M, Pai GP, Shetty P. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*. Medknow Publications; 2013 Jan;17(1):42–6.
88. Khan A. Detection and quantitation of forty eight cytokines, chemokines, growth factors and nine acute phase proteins in healthy human plasma, saliva and urine. *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V.; 2012;75(15):4802–19.
89. Al-Sabbagh M, Alladah A, Lin Y, Kryscio RJ, Thomas M V, Ebersole JL, et al. Bone remodeling-associated salivary biomarker MIP-1 α distinguishes periodontal disease from health. *Journal of periodontal research*. 2012 Jun;47(3):389–95.
90. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*. 2014;5(November):1–9.
91. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014;6(March):13.
92. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS ONE*. 2013;8(11):1–11.
93. Jeganathan S, Fiorino C, Naik U, Sun HS, Harrison RE. Modulation of osteoclastogenesis with macrophage M1- and M2-inducing stimuli. *PLoS ONE*. 2014;9(8).

APÊNDICES

Apêndice I - Questionário do Dador

1. Informação geral acerca do dador

1.1 Data nascimento: ____/____/____

1.2 Género:

Masculino

Feminino

1.3 Dados Biométricos:

Altura: _____ Cm Peso: _____ Kg Perímetro Abdominal: _____
cm

1.4 Etnia:

Caucasiana

Negra

Asiática

Cigana

Outra. Qual? _____

1.5 Área de residência:

Aldeia

Vila

Cidade

1.6 Estado civil:

Solteiro

Casado

Vive maritalmente

Viúvo

Divorciado

1.7 Nível de escolaridade:

Básico (abaixo do 9º Ano) Médio (12º Ano)

Licenciatura, Mestrado e/ou Doutoramento

1.8 Profissão: _____

1. Hábitos Tabágicos

2.1 Fuma ou já fumou?

Não

Sim

Ex-fumador. Há quantos anos deixou de fumar? _____ Anos

2.2 Se sim:

2.2.1 Com que idade começou a fumar: _____ anos

2.2.2 Quantos cigarros fuma por dia: _____ cigarros

2. Consumo de Álcool

3.1 Bebe bebidas alcoólicas?

Não Passe para a questão 3.4 Sim.

Com que idade começou a beber: _____ anos

3.2 Frequência do consumo de álcool Nº copos de vinho/semana _____ Nº
cervejas/semana _____

Nº de digestivos/semana) _____

3.3 Deixou de beber?

Não Sim. Há quantos anos deixou de beber? _____ anos.

3. Exercício Físico

Questionário de Baecke para Avaliação da atividade física habitual em adultos (1) (Adaptado)					
Por favor, circule a resposta apropriada para cada questão pensando nos últimos 12 meses					
1. Você pratica ou praticou desporto ou exercício físico nos últimos 12 meses:	Sim		Não		
1.1 Qual desporto ou exercício físico pratica ou praticou mais frequentemente?					
1.1.1 Quantas horas por semana?					
1.1.2 Quantos meses por ano?					
1.2 Se pratica ou praticou outro desporto ou exercício físico além do anterior, qual o tipo?	Sim		Não		
1.2.1 Quantas horas por semana?					
1.2.2 Quantos meses por ano?					
	1	2	3	4	5
2. Em comparação com outros da minha idade, eu penso que minha atividade física durante as horas de lazer é:	Muito menor	Menor	A mesma	Maior	Muito maior
3. Durante as horas de lazer eu sudo:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
4- Durante as horas de lazer eu pratico desporto ou exercício físico:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
5. Durante as horas de lazer eu vejo televisão:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
6. Durante as horas de lazer eu ando:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
7. Durante as horas de lazer eu ando de bicicleta:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
8. Durante quantos minutos por dia você anda a pé ou de bicicleta indo e voltando do trabalho, escola ou compras? Total de minutos: _____	< 5	5-15	16-30	31-45	> 45

1-Florindo A, Latorre M. Validação e reprodutibilidade do questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. Rev Bras Med Desporto [Internet]. 2003 [citado em 2014 Dez 15];9(11):121-8. Disponível em: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Validação+e+reprodutibilidade+do+questionário+de+Baecke+de+avaliação+da+atividade+física+habitual+em+homens+adultos+*#0

4. Hábitos Alimentares

	Nunca (0 vezes/ semana)	Raramente (1 a 2 vezes/semana)	Algumas vezes (3 a 4 vezes/semana)	Muitas vezes (5 a 6 vezes/semana)	Sempre (7 ou mais vezes/semana)
Após acordar tenho por hábito tomar o café da manhã.					
Como e mastigo devagar.					
Passo muitas horas sem comer.					
Faço 5 ou 6 refeições por dia.					
Faço refeições com intervalos de 3 a 4 horas.					
O jejum noturno não ultrapassa as 10 horas.					
Ingiro leite/iogurte/queijo.					
Como fruta.					
Como legumes e hortaliças.					
Como sopa.					
Como alimentos integrais ricos em fibra.					
Como carnes gordas.					
Como carnes magras.					
Adiciono aos alimentos produtos industriais.					
O azeite faz parte da minha alimentação.					
Consumo molhos gordos.					
Como pizzas, hambúrgueres e cachorros-quentes.					
Consumo produtos de charcutaria.					
Prefiro a comida com um pouco de sal a mais.					
Ingiro alimentos salgados.					
Ingiro alimentos ricos em açúcar.					
No lanche, como um bolo ou um salgado.					
Quando como um doce opto por fazê-lo...					
Prefiro comer bolos/bolachas do que comer pão.					
Utilizo bastante açúcar para adoçar.					
Adoto uma alimentação variada às refeições.					
Faço uma refeição de peixe.					
Faço uma alimentação à base de cozidos e grelhados.					
Costumo comer as partes queimadas dos alimentos.					
Como alimentos fritos e assados no forno.					
Faço refeições abundantes.					
Petisco entre refeições.					
Como quase sempre o mesmo tipo de alimentos.					
Consumo bebidas alcoólicas fora das refeições.					
Só bebo água quando tenho sede.					
Bebo pelo menos 1,5 L de água por dia.					
Consumo alimentos pré-cozinhados e enlatados.					
Como pão de mistura tipo caseiro.					
Como arroz/massa e batata.					
Como peixes gordos.					

Marques A, Luzio F, Martins J, Vaquinhas M. Hábitos alimentares: Validação de uma escala para a população portuguesa. Esc Anna Nery. 2011;15(2): 402-9.

6. Saúde

6.1 Grupo Sanguíneo

A B AB O

Rh+ Rh-

Não sabe

6.2 Toma regularmente medicamentos?

Não Sim

6.3 Indique todos os medicamentos que toma regularmente:

Medicação (DCI)	mg	Há quantos anos começou

6.4 Tomou alguma medicação que não seja a indicada na tabela acima referida nos últimos 30 dias?

Não Sim. Qual? _____

6.5 Tomou algum antibiótico nos últimos 3 meses?

Não Sim. Qual? _____

6.6 Tomou corticosteroides nos últimos 30 dias?

Não Sim

6.7 Tomou bifosfonatos nos últimos 30 dias?

Não Sim

6.8 Tem as vacinas em dia?

Não Sim

→ **Se é homem passe para a questão 6.13.**

6.9 Está grávida?

Não Sim. De quantos meses? _____ meses.

6.10 Encontra-se na menopausa?

Não Sim. Há quanto tempo? _____ meses.

6.11 Há quanto tempo teve a última menstruação? _____ dias.

6.12 Toma anticoncepcionais?

Não Sim. Qual? _____

6.13 Nos últimos 12 meses foi consultado por um médico?

Não Sim

6.14 Se sim, que especialidade? (Pode selecionar mais do que uma opção)

Médico de consulta geral e familiar Dermatologista
 Gastroenterologia Ortopedista
 Outro (s) _____

6.15 Qual a data das últimas análises que efetuou? ____/____/____

6.16 Foram encontrados valores anormais?

Não Sim. Quais? _____

6.17 Tem hipertensão?

Não Sim

6.18 Atualmente sofre de alguma enfermidade?

Não Sim

6.19 Se sim, qual? (Pode selecionar mais do que uma opção)

Problemas cardíacos:

Doença das artérias coronárias Ataque cardíaco
 Angina Aneurisma da aorta
 Arritmias Doença cardíaca congénita
 Insuficiência cardíaca Doença cardíaca reumática
 Outro(s) _____

Diabetes:

Tipo 1 Tipo 2

Análise Clínica	Valores
Colesterol	
Glicose	
Hemoglobina glicosilada	

Doenças auto-imunes:

Doença de Crohn Doença de Behçet
 Doença de Graves Síndrome de Sjogren
 Outra: _____

Doenças de sangue. Quais? _____

- Doenças infeto-contagiosas. Quais? _____
- Doenças de fígado. Quais? _____
- Problemas de estômago. Quais? _____
- Problemas renais. Quais? _____
- Epilepsia
- Asma
- Urticária
- Sinusite
- Acne
- Outra (s). Quais? _____

6.20 Alergias

6.20.1 É alérgico a algum medicamento ou dispositivo médico?

- Não Sim. Qual? _____

6.20.2 É alérgico a algum alimento?

- Não Sim. Qual? _____

6.20.3 É alérgico a picadas de insetos?

- Não Sim. Qual? _____

6.21 Foi sujeito a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?

- Não Sim. Há quanto tempo? _____ meses.

6.22 História Familiar – Existem doenças na família como:

- Doenças Cardíacas Diabetes Cancro Não sabe
- Outras, quais? _____

7. Patologia do sono

Sono (Escala de sonolência de Epworth, adaptada por Santos CR (2001))	Nunca	Raramente	Por vezes	Frequentemente	N/A	24-Score
Nas últimas duas semanas:						
adormeceu sentado e a ler						
adormeceu a ver tv						
adormeceu sentado em local público						
adormeceu como passageiro de um carro, uma hora sem intervalo						
adormeceu deitado para descansar após o almoço						
adormeceu sentado e a falar com alguém						
adormeceu sentado após o almoço sem ingerir álcool						
adormeceu a conduzir um carro em tráfego lento						
Ao deitar teve dificuldade de dormir?						
Acordou durante o sono e teve dificuldade para adormecer de novo?						
Acordou muito cedo e não conseguiu voltar a adormecer?						

8. Escala de Felicidade Subjetiva (SHS)

Desenvolvida por: Sonja Lyubomirsky.

Instruções: Para cada uma das seguintes frases, por favor, escolha o ponto da escala que o descreve de forma mais apropriada.

1 2 3 4 5 6 7

Uma
pessoa
não muito
feliz

Uma
pessoa
muito feliz

1	Em geral, considero-me:	
2	Comparado com os meus pares, considero-me:	
3	Algumas pessoas são geralmente muito felizes. Apreciam a vida independentemente do que se passa à sua volta, aproveitando o melhor de tudo. Como considera essa pessoa?	
4	Algumas pessoas não são geralmente felizes. Embora não estejam deprimidas, nunca parecem tão felizes como poderiam ser. Como considera essa pessoa?	

9. Escala de Satisfação com a Vida (SWLS)

Desenvolvida por: Ed Diener

Instruções: Abaixo encontrará cinco afirmações com as quais pode ou não concordar. Usando a escala de resposta a seguir, que vai de 1 a 7, indique o quanto concorda ou discorda com cada uma; escreva um número no espaço ao lado da afirmação, segundo sua opinião. Por favor, seja o mais sincero possível nas suas respostas.

- 7 = Concordo totalmente
- 6 = Concordo
- 5 = Concordo ligeiramente
- 4 = Nem concordo nem discordo
- 3 = Discordo ligeiramente
- 2 = Discordo
- 1 = Discordo totalmente

1. _____ Na maioria dos aspetos, a minha vida é próxima ao meu ideal.
2. _____ As condições da minha vida são excelentes.
3. _____ Estou satisfeito(a) com minha vida.
4. _____ Dentro do possível, tenho conseguido as coisas importantes que quero da vida.
5. _____ Se pudesse viver uma segunda vez, não mudaria quase nada na minha vida.

10. Questionário de Qualidade de Vida, Saúde e Outras Áreas

Este questionário procura conhecer a sua qualidade de vida, saúde, e outras áreas da sua vida. Por favor, tenha presente os seus padrões, expectativas, alegrias e preocupações. Pedimos-lhe que tenha em conta a sua vida nas duas últimas semanas. Coloque um círculo à volta do número que melhor descreve a sua situação.

		Muito Má	Má	Nem Boa Nem Má	Boa	Muito Boa
1 (G1)	Como avalia a sua qualidade de vida?	1	2	3	4	5

		Muito Insatisfeito	Insatisfeito	Nem satisfeito nem insatisfeito	Satisfeito	Muito Satisfeito
2 (G4)	Até que ponto está satisfeito(a) com a sua saúde?	1	2	3	4	5

		Nada	Pouco	Nem muito nem pouco	Muito	Muitíssimo
3 (F1.4)	Em que medida as suas dores (físicas) o(a) impedem de fazer o que precisa de fazer?	1	2	3	4	5
4 (F11.3)	Em que medida precisa de cuidados médicos para fazer a sua vida diária?	1	2	3	4	5
5 (F4.1)	Até que ponto gosta da vida?	1	2	3	4	5
6 (F24.2)	Em que medida sente que a sua vida tem sentido?	1	2	3	4	5
7 (F5.3)	Até que ponto se consegue concentrar?	1	2	3	4	5
8 (F16.1)	Em que medida se sente em segurança no seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
9 (F22.1)	Em que medida é saudável o seu ambiente físico?	1	2	3	4	5

		Nada	Pouco	Moderadamente	Bastante	Completamente
10 (F2.1)	Tem energia suficiente para a sua vida diária?	1	2	3	4	5
11 (F7.1)	É capaz de aceitar a sua aparência física?	1	2	3	4	5
12 (F18.1)	Tem dinheiro suficiente para satisfazer as suas necessidades?	1	2	3	4	5
13 (F20.1)	Até que ponto tem fácil acesso às informações necessárias para organizar a sua vida diária?	1	2	3	4	5
14 (F21.1)	Em que medida tem oportunidade para realizar actividades de lazer?	1	2	3	4	5

		Muito Má	Má	Nem boa nem má	Boa	Muito Boa
15 (F9.1)	Como avaliaria a sua mobilidade [capacidade para se movimentar e deslocar por si próprio(a)]?	1	2	3	4	5

Índice de Higiene Oral

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Total _____ %

Total _____ %

SILNESS E LÖE
 0 - ausência de placa
 1 - placa detectada com sonda
 2 - placa visível
 3 - placa abundante

Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy II. Correlation Between Oral Hygiene and Periodontal Condition. Informa UK Ltd. UK; 2009 Jul 2 [citado 2014 Dez 16]; Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00016356408993968?journalCode=ode>

Periodontal Screening Record (PSR)

1º S	2º S	3º S
6º S	5º S	4º S

Grau de PSR	Situação Correspondente
0	Saúde periodontal
1	Hemorragia à sondagem (BOP)
2	Presença de cálculos, margens iatrogénicas e/ou BOP
3	Bolsas periodontais entre 3,5mm e 5,5mm
4	Bolsas periodontais superiores a 6mm
*	Envolvimento de furca, mobilidade, recessões, ausência de gengiva aderida com possibilidade de originar lesões

Landry RG, Jean M. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. International Dental Journal [Internet]. 2002 Fev 6 [citado 2014 Dez 16];52(1):35-40. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1875-595X.2002.tb00595.x>

Sangramento à sondagem (BOP): _____

Diagnóstico Periodontal: _____

Apêndice II - Levantamento dos Processos da Clínica Universitária de Pacientes com Periodontite e de Pacientes com Periodontite e Crônica e Diabetes Mellitus tipo 2

Outubro de 2014

Distribuição dos Pacientes com Periodontite Por Género				
Masculino		Feminino		Total
xi	%	xi	%	xi
159	45,56%	190	54,44%	349

Intervalo de Idades dos Pacientes com Periodontite			
Masculino		Feminino	
Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
24	87	29	76

Distribuição dos Pacientes com Periodontite e Diabetes Por Género				
Masculino		Feminino		Total
xi	%	xi	%	xi
26	63,41%	15	36,59%	41

Intervalo de Idades dos Pacientes com Periodontite e Diabetes			
Masculino		Feminino	
Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
39	77	52	87

ANEXOS

Anexo I - Consentimento Informado do Instituto de Medicina Molecular

INFORMAÇÃO AO DADOR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Título do projeto de investigação

Identificação de biomarcadores salivares de doença periodontal em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2

Projeto de investigação que irá decorrer no SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa.

Objetivo do Estudo

A recolha de amostras biológicas humanas e seu posterior armazenamento no Biobanco de amostras do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, permitirá a realização de investigação para o esclarecimento a nível molecular de doenças e para o desenvolvimento de diagnóstico e em múltiplas áreas da Saúde. Contudo, este objetivo só será cumprido com a colaboração dos doentes e de indivíduos saudáveis, através da doação de amostras biológicas que serão guardadas e preservadas em condições apropriadas de forma a serem utilizadas para futuros estudos. Caso o doente ou indivíduo saudável e/ou o seu representante legal decida participar, terá de fazer apenas os procedimentos habituais de uma consulta.

Procedimentos

No caso de concordar em participar neste projeto, ser-lhe-á colhida uma amostra biológica. A amostra habitualmente solicitada será realizada a partir da colheita de saliva. Para os indivíduos que estejam a realizar exames diagnósticos ou que estejam a ser sujeitos a tratamentos cirúrgicos poderá ser pedida autorização para colheita de uma pequena amostra do material removido durante o procedimento (como por exemplo tecidos removidos para biópsias ou removidos no decurso de cirurgias). Estas colheitas serão efetuadas sem alterar os procedimentos médicos habituais e sem interferir com a rentabilidade diagnóstica do procedimento ou com o sucesso da cirurgia. Esta amostra será preservada em condições apropriadas e as informações clínicas com ela relacionada serão introduzidas numa base de dados, passando a sua identificação pessoal a estar codificada e não acessível aos utilizadores das amostras.

A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador, ou o seu representante legal, tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração assim que achar conveniente, sem necessidade de justificação e não podendo ser discriminado por isso. O dador ou o seu representante legal deverá manifestar por escrito a sua vontade em retirar a amostra ou interromper a colaboração e nestas situações a amostra será imediatamente destruída.

O SalivaTec propõe-se armazenar as amostras biológicas e seus possíveis derivados tais como DNA e RNA nas instalações do Biobanco do Instituto de Medicina Molecular. O SalivaTec não divulgará resultados envolvendo o material biológico. No entanto, o dador poderá escolher se quer ser informado dos resultados com potencial relevância para a sua saúde. O pedido de resultados deverá ser feito por escrito para o SalivaTec pelo dador ou representante legal e deve ser expresso no consentimento informado.

Serão cumpridas todas as normas éticas aceites internacionalmente para o uso de matérias biológicas para fins de investigação. Todos os projetos que fizerem uso das amostras depositadas no Biobanco serão submetidos à Comissão de Ética competente para a sua avaliação.

Identificação das amostras e Confidencialidade

A existência de um Biobanco pressupõe a existência de uma base de dados contendo informação clínica referente ao doente ou indivíduo saudável. Após a colheita, as amostras serão identificadas por um código de forma a preservar a privacidade.

Durante o desenvolvimento de um projeto de investigação, a equipa de investigação poderá ter necessidade de recolher informação do processo clínico para a execução do estudo. O anonimato será, contudo mantido, ou seja os dados constantes do seu processo clínico serão fornecidos ao investigador, mas sem qualquer identificação, ou qualquer informação que permita saber a quem pertencem.

A descodificação apenas poderá ser efetuada pelo médico (que será o responsável pela base de dados, de acordo com a informação fornecida à Comissão Nacional de Proteção de Dados - CNPD), em caso de absoluta necessidade, por motivos de saúde do dador e, a pedido deste, e sempre de acordo com as disposições legais em vigor.

Os dados serão tratados confidencialmente, de acordo com a Lei, com os regulamentos e de acordo com as normas éticas aprovadas pela Comissão de Ética da Universidade Católica Portuguesa.

Os dados resultantes dos estudos realizados serão alvo de publicação de uma forma anónima e agregada, em termos de percentagens ou de dados numéricos, nunca individualmente.

Tempo de conservação

As amostras serão conservadas por um período de 20 anos no Biobanco do Instituto de Medicina Molecular (IMM), sob a responsabilidade da Equipa ligada ao SalivaTec, enquanto este estiver devidamente credenciado pelas entidades competentes. As coleções de amostras serão avaliadas periodicamente, nomeadamente para aferir da sua qualidade, podendo ser destruídas ou, findo o período da conservação, poder-se-á solicitar a prorrogação da conservação. Nestas condições excecionais o SalivaTec poderá voltar a contactar os dadores.

Comunicação e divulgação de dados

Os dados genéticos e as amostras biológicas colhidas para fins de investigação científica podem ser transferidos para outras organizações ou centros de investigação, para fins de pesquisa e somente em projetos desenvolvidos conjuntamente com o SalivaTec, mediante consentimento do participante expresso na declaração de consentimento informado.

Possíveis Benefícios para os Participantes

Esta é uma doação altruísta, não havendo por isso qualquer compensação para o dador. Não se garante que este estudo envolva quaisquer benefícios diretos para o participante. Se algum dos estudos puder ser relevante para a saúde do dador, este será informado, se essa for a sua vontade expressa na declaração de consentimento informado. Contudo, a sua participação proporcionará a aquisição de conhecimentos que poderão vir a beneficiá-lo a si ou a terceiros no futuro.

Riscos físicos previsíveis

Na maioria dos casos, os riscos e o desconforto associados serão mínimos ou inexistentes. Nas colheitas associadas a procedimentos com fins diagnósticos ou terapêuticos, os riscos e o desconforto serão os inerentes ao procedimento em si.

Em qualquer dos casos, o dador será sempre antecipadamente informado dos riscos e grau de desconforto associados aos procedimentos.

Participação Voluntária e Direitos de Abandono

O presumível dador terá toda a liberdade para se recusar a participar no estudo ou retirar o seu consentimento, suspendendo a participação em qualquer momento e, conseqüentemente, as amostras serão destruídas. A participação é voluntária e a sua recusa em participar não envolverá qualquer penalização ou perda de benefícios. A recusa ou abandono não colocarão em risco o direito a receber tratamento ou assistência médica, presentemente ou no futuro.

O dador poderá retirar o seu consentimento nas modalidades **sem contacto futuro** (as amostras poderão ser usadas normalmente até se esgotarem, mas não serão estabelecidos futuros contactos para a obtenção de mais amostras) ou **sem uso futuro** (não serão estabelecidos futuros contactos e as amostras serão imediatamente destruídas e os registos eliminados).

Se tiver qualquer dúvida, em qualquer momento, mesmo após a colheita, sobre este estudo poderá contactar a Diretora do SalivaTec: Prof. Doutora Marlene Barros, dirigindo-se a:

SalivaTec

Departamento de Ciências da Saúde

Universidade Católica Portuguesa

Tel. +351232419500 - Fax +351232428344

E-mail: mbarros@crb.ucp.pt

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Banco de amostras biológicas para fins de investigação biomédica

Investigador: _____ Local de recolha: _____
Nome do dador: _____
Número de estudo do dador: _____

Eu, _____, portador do bilhete de identidade/cartão do cidadão n.º [_____], declaro ter tomado conhecimento e aceitar participar neste projeto, de forma a contribuir para a criação de um banco de amostras biológicas com informação clínica associada, para fins de investigação biomédica. Aceito que a minha amostra biológica seja utilizada em projetos de investigação de mecanismos das doenças, diagnóstico precoce, fatores de prognóstico e novos alvos terapêuticos em múltiplas áreas da medicina. Poderei revogar a autorização para utilização da minha amostra biológica e informação clínica em qualquer altura. O objetivo do banco de amostras biológicas foi-me claramente explicado e foi-me dada a oportunidade de colocar questões sobre o seu funcionamento, bem como os procedimentos relativos à colheita e utilização da minha amostra biológica e dados a ela associados.

Declaro que aceito participar, voluntariamente, neste estudo. Especificamente concordo com os seguintes pontos:

• Consinto a colheita de material biológico (saliva / /) e autorizo a conservação de amostras no Biobanco, de modo a que possam ser usados para pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos por investigadores portugueses e estrangeiros, sem fins lucrativos;

Sim Não

• **Esta opção é para ser respondida apenas por participantes que já cederam amostras biológicas colhidas no âmbito de outros projetos.** Nestas circunstâncias, autorizo a transferência para o Biobanco das minhas amostras biológicas, previamente colhidas no âmbito de outros projetos, de modo que elas possam ser utilizadas em pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos por investigadores portugueses e estrangeiros, mas sem fins lucrativos;

Sim Não

• Estou consciente de que a minha participação é voluntária e que posso em qualquer altura solicitar a destruição das minhas amostras biológicas, invalidando assim o consentimento informado prévio, sem justificar, tendo recebido a garantia de que o meu pedido não desenvolverá discriminação;

Sim Não

• Declaro que quero conhecer resultados que possam ser relevantes para a minha saúde.

Sim Não

• Autorizo ser contactado novamente pelo Biobanco para pedido de atualização sobre a minha situação clínica;

Sim Não

• Autorizo o contactado do Biobanco a familiares meus para pedido autorização de colheita de amostras biológicas e/ou informação clínica;

Sim Não

Data

Assinatura do Dador/Representante Legal

Em caso de representante legal, este atua na qualidade de:

- Titular do poder paternal, quando o dador é menor
- Tutor, quando o dador foi declarado interdito
- Herdeiro, quando o dador faleceu

Discuti este estudo de investigação com o participante e/ou o seu representante legal, utilizando uma linguagem compreensível e apropriada. Informei adequadamente o participante sobre a natureza deste estudo e sobre os seus possíveis benefícios e riscos, considerando que o participante compreendeu a minha explicação.

Data

Nome do Investigador/ Médico

Assinatura do Investigador/ Médico

Anexo II - Protocolo de colheita de saliva do SalivaTec

Material para a colheita:

- ✓ Cotton rol (rolos de algodão utilizados na clínica dentária para manter a zona de intervenção seca);
- ✓ Pinça estéril;
- ✓ Tubo Falcon de 15 mL, estéril e devidamente etiquetado, contendo 1 ponta de micropipeta (P1000);

Nota: O tubo deve estar preenchido com uma ponta de micropipeta de 1000 µL de modo a servir de suporte aos rolos de algodão. Como o tubo será sujeito a centrifugação a saliva passará para o fundo do tubo e os rolos de algodão podem ser removidos com facilidade pois mantém-se no topo da ponta de micropipeta.

- ✓ Arca frigorífica para acondicionar as amostras (necessária para o transporte até ao laboratório).

Método de recolha

1. As amostras devem ser recolhidas aproximadamente à mesma hora (de preferência entre as 8h e as 10h da manhã);

Nota: Os dadores não devem comer, beber ou ter qualquer procedimento de higiene oral pelo menos 1 hora antes da colheita de saliva. Ou seja deverão ter feito a higiene oral e tomado o pequeno almoço uma hora antes da colheita da saliva.

2. Os dadores devem bochechar vigorosamente a boca com água antes da colheita durante 30 segundos;
3. Após o processo de bochechar, esperar 1 minuto sem engolir (para voltar a sentir conforto);
4. Colocar 2 rolos de algodão estéreis sob a língua do dador – recolha sublingual.
5. Manter os rolos durante 2 minutos.
6. Recolher com uma pinça estéril os rolos e coloca-los no tubo de Falcon sobre a ponta de micropipeta;

7. Caso a recolha seja realizada longe do laboratório, os tubos devem ser imediatamente armazenados no frio (arca refrigeradora) e posteriormente processados de acordo com a descrição abaixo;
8. Caso a recolha seja realizada perto do laboratório (por exemplo na clínica da UCP), os tubos devem ser imediatamente centrifugados a 10000xg durante 10 minutos a 4 °C;
9. De seguida retiram-se com uma pinça esterilizada os rolos de algodão dos tubos e também a ponta de micropipeta.
10. Homogeneizar a amostra de saliva usando um vortex e distribuir o volume de amostra obtido em alíquotas de 200 µL usando tubos de crio-conservação.
11. Congelar as amostras a -80°C.

Cuidados a ter antes da recolha de saliva:

- ✓ Não comer, beber ou ter qualquer procedimento de higiene oral 1 hora antes da recolha de saliva. Este facto não invalida a toma do pequeno-almoço ou a lavagem dos dentes, pelo contrário, os dadores devem escovar os dentes e tomar o pequeno-almoço como normalmente e passada uma hora pode procede-se à recolha de saliva;
- ✓ Recolher as amostras aproximadamente à mesma hora, de preferência entre as 8h e as 10h da manhã.