



**CATÓLICA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

---

LISBOA · PORTO · VISEU

***ESTUDO PILOTO DE AVALIAÇÃO DA GLICOSE  
SALIVAR EM SENIORES***

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa*

*Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária.*

Por

Vanessa Miranda

Viseu

2016





**CATÓLICA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

---

LISBOA · PORTO · VISEU

***ESTUDO PILOTO DE AVALIAÇÃO DA GLICOSE  
SALIVAR EM SENIORES***

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa*

*Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária.*

Por

Vanessa Miranda

Sob a orientação da Professora Doutora Joana Salgado e co-orientação de Mestre Tiago  
Marques

Viseu

2016



*“No one can make you feel inferior without your consent.”*

Eleanor Roosevelt



## **Agradecimentos**

*À Professora Doutora Joana Salgado,*

Pela dedicação na realização deste trabalho, pelos ensinamentos, tranquilidade e confiança transmitidos ao longo destes meses e por sempre acreditar neste projeto. Para além de ser uma referência de profissionalismo, tornou-se uma amiga para a vida.

*Ao Mestre Tiago Marques,*

Pela ajuda, disponibilidade e pelo conhecimento partilhado.

*Aos Professores Doutores Nuno Rosa e Maria José Correia,*

Pela disponibilidade incondicional e colaboração demonstrada no decorrer deste trabalho, e ainda pelo apoio e interesse na elaboração de futuros artigos para publicação.

*Aos alunos finalistas de Ciências de Biomédicas 2015/2016,*

Pela simpatia, boa disposição e colaboração demonstrada ao longo deste estudo. Sem eles este projeto nem sequer teria existido.

*Ao Professor Doutor Nélcio Veiga,*

Pelo interesse e apoio na realização desta tese, pela disponibilidade e por ter sempre uma palavra amiga.

*Aos meus pais, João e Maria Eduarda,*

Pelo amor, carinho, apoio incondicional, confiança e incentivo. Obrigada pelos valores transmitidos que fizeram de mim a mulher e profissional que sou hoje. Vocês são a minha vida.

*Ao meu irmão, Nuno,*

Pelo amor e amizade, por sempre acreditar em mim e pelo positivismo incansável sendo um exemplo para a humanidade. És o meu orgulho.

*Ao Francisco,*

Pelo amor, cumplicidade, positivismo e apoio incondicional nos momentos mais difíceis da minha vida.

*Às minhas melhores amigas, Amandine, Isra e Cátia,*

Pela amizade, apoio, confiança, por estarem sempre presentes e pelas palavras de encorajamento nos momentos mais difíceis.

*Aos meus amigos e família,*

Pela amizade, amor e apoio constante.

*Aos meus colegas,*

Por uma vida académica repleta de recordações.

*A todos os professores, assistentes e funcionários,*

Aos quais devo todo a minha aprendizagem académica durante estes cinco anos.

## Resumo

A diabetes é uma doença metabólica caracterizada por uma hiperglicemia. O aumento da prevalência da diabetes e das suas complicações associadas, implica uma necessidade crescente de novas estratégias para uma identificação precoce dos indivíduos de risco. De uma forma geral, o controlo da diabetes é feito através de uma metodologia invasiva que implica a medição da glicemia plasmática. No entanto, a avaliação da glicose salivar começa a ser aceite na comunidade científica e tem vindo a ser alvo de vários estudos para averiguar as principais vantagens desta metodologia. As complicações associadas à hiperglicemia são amplamente conhecidas, nomeadamente na saúde da cavidade oral com o desenvolvimento da doença periodontal. No entanto, a relação entre glicose medida na saliva e os seus efeitos no desenvolvimento da periodontite ainda não está bem caracterizada e até ao momento nenhum estudo foi realizado na população diabética portuguesa.

Sendo assim, neste trabalho de investigação pretende-se utilizar uma metodologia não invasiva para avaliação de glicose e perceber qual o efeito da glicose na cavidade oral e no desenvolvimento de patologia periodontal. Assim, para este estudo foram definidos 3 grandes objetivos:

1. Estabelecer uma metodologia para a determinação dos níveis de glicose salivar e a otimização de uma técnica que inclui recolha, armazenamento e processamento da amostra, com o intuito final de avaliar o valor da glicose salivar;
2. Avaliar os níveis de glicose salivar num grupo de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 e comparar com um grupo de indivíduos saudáveis (grupo controlo);
3. Avaliar o papel da glicose salivar no desenvolvimento da patologia periodontal.

Os níveis de glicose salivar foram determinados pela metodologia de oxidação da glicose através de uma nova adaptação ao método de D-Glicose GOD-POD. O diagnóstico periodontal das amostras foi baseado no registo clínico periodontal da Clínica Dentária Universitária do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Católica Portuguesa (UCP) em Viseu. Neste estudo foi possível otimizar a avaliação do valor da glicose salivar recorrendo a uma metodologia de determinação dos níveis da glicose na saliva e com o estabelecimento de um novo protocolo - *Standard Operating protocol* (SOP).

Os nossos resultados demonstraram que a glicose salivar dos diabéticos era superior ao valor da glicose dos não-diabéticos. No entanto, os níveis de glicose salivar em função do género, idade do doente e da duração da diabetes não demonstraram ter diferenças significativas. Por outro lado, observou-se na situação de hiperglicose (diabéticos e controlos) há uma maior incidência da patologia oral. Quando os indivíduos foram questionados relativamente à preferência pela metodologia invasiva e não invasiva foi notório a preferência pelo método de determinação de glicose salivar.

Em conclusão, com este trabalho foi possível implementar uma metodologia para avaliação da glicose salivar na Clínica Dentária Universitária do ICS da UCP em Viseu. Por outro lado, com esta metodologia foi possível observar um aumento da glicose salivar nos indivíduos diabéticos relativamente aos controlos.

**Palavras-chave:** Diabetes, Saliva, Hiperglicemia, Glicose salivar, Periodontite.

## Abstract

Diabetes is a metabolic disorder characterized by a hyperglycemia. The increasing prevalence of diabetes and its associated complications imply a growing need for new strategies for early identification of individuals at risk. In general, the control of diabetes occurs through an invasive method that involves the measurement of plasma glucose. However, the assessment of salivary glucose begins to be well accepted in the scientific community and several studies were performed to ascertain the main advantages of this methodology. The complications associated with hyperglycemia are widely known, particularly in the health of the oral cavity with the development of periodontal disease. However, the relationship between glucose measured in saliva and its effects on the development of periodontitis is not well characterized and so far no study has been conducted in Portuguese diabetic population.

With this project we aim to use a non-invasive method for glucose determination and to understand the effect of glucose in the oral cavity and its effect at periodontal disease. Therefore, three main objectives were defined for this study:

1. To establish a methodology for the determination of salivary glucose levels and the optimization of a technique that includes collection, storage and processing of the sample;
2. To evaluate the salivary glucose levels in a group of diagnosed T2DM subjects and to compare with healthy subjects (control group);
3. To assess the role of salivary hyperglucose in periodontal disease evolution.

The salivary glucose levels were determined by using the glucose oxidation method and by applying a new adaptation to the D-Glycose GOD-POD method. Periodontal diagnosis of samples was based on periodontal clinical record in the University Dental Clinics of the Health Sciences Institute of the Portuguese Catholic University, in Viseu. In this study it was possible to optimize the assessment of the value of salivary glucose using a methodology for determining glucose levels in saliva, with the establishment of a new protocol – *Standard Operating Protocol* (SOP).

Our results showed that the salivary glucose levels of diabetics were higher than the levels of non-diabetics. However, salivary glucose levels based on gender, age of the patient and duration of diabetes have not shown significant differences. Moreover, it was observed that in a hyperglucose situation there is a higher incidence of oral disease.

When subjects were asked regarding the preference for invasive and non-invasive methodology the preference for the method of salivary glyucose determination was notorious.

In conclusion, with this project it was possible to implement a methodology to assess the salivary glucose in the University Dental Clinics of the *Health Sciences Institute* of the *Portuguese Catholic University*, in Viseu. Furthermore, with this methodology it was possible to observe an increase of the salivary glucose in diabetic subjects compared to control subjects.

**Keywords:** Diabetes, saliva, hyperglycaemia, salivary glyucose, periodontitis.

# Índice geral

Resumo.....	III
Abstract .....	V
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Diabetes <i>Mellitus</i> .....	2
1.1.1. Epidemiologia e classificação .....	3
1.1.2. Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1 e tipo 2.....	4
1.1.3. Fisiopatologia.....	7
1.1.4. Diagnóstico.....	8
1.1.5. Complicações .....	10
1.1.6. Manifestações orais .....	11
1.1.7. Tratamento .....	14
1.2. O periodonto.....	15
1.2.1. A doença periodontal .....	16
1.2.2. Fisiopatologia .....	17
1.2.3. Classificação.....	18
1.2.4. Parâmetros clínicos .....	20
1.2.5. Tratamento .....	23
1.3. Periodontite e Diabetes <i>Mellitus</i> .....	24
1.3.1. Efeito do tratamento periodontal e do controlo metabólico nos pacientes diabéticos.....	25
1.4. Saliva.....	26
1.4.1. A saliva como fluido de diagnóstico .....	27
1.4.2. Níveis de glicose salivar na Diabetes <i>Mellitus</i> .....	28
2. OBJETIVOS .....	31
3. METODOLOGIA .....	35
3.1. Procedimento para a determinação da glicose salivar.....	35
3.1.1. Colheita, processamento e armazenamento da saliva.....	35

3.1.2.	Preparação dos reagentes.....	36
3.1.3.	Doseamento para as amostras e para a reta de calibração .....	36
3.1.4.	Reta de calibração .....	38
3.1.5.	Determinação dos níveis de glicose salivar.....	38
3.2.	Registo Clínico Periodontal .....	38
3.3.	Análise estatística.....	39
4.	RESULTADOS.....	43
4.1.	Otimização da técnica de doseamento de glicose salivar.....	43
4.2.	Os valores de glicose salivar num grupo de indivíduos diabéticos e indivíduos saudáveis .....	44
4.2.1.	Determinação da glicose salivar nos indivíduos diabéticos e não-diabéticos .....	44
4.2.2.	Correlação da glicose salivar entre os indivíduos diabéticos e não-diabéticos ...	47
4.2.3.	Relação entre os valores de glicemia sanguínea e a glicose salivar nos diabéticos	48
4.2.4.	Correlação entre a glicose salivar e o género .....	49
4.2.5.	Correlação entre a glicose salivar nos diabéticos em função do tempo de diabetes e da idade dos pacientes .....	50
4.2.6.	O efeito da glicose salivar na periodontite .....	51
4.2.7.	Avaliação do grau de satisfação dos pacientes diabéticos e a técnica de medição de saliva não invasiva.....	53
5.	DISCUSSÃO.....	57
6.	CONCLUSÃO .....	67
7.	BIBLIOGRAFIA.....	71
	ANEXOS.....	77

## Índice de ilustrações

Ilustração 1 – Esquema ilustrativo da fisiopatologia da libertação de insulina.....	8
Ilustração 2 – O periodonto é composto pelos seguintes tecidos: Gengiva (G), Ligamento periodontal (PL), Cimento radicular (RC), e o osso alveolar (AP).....	16
Ilustração 3 – A, Imagem clínica de gengivite. B, Status radiográfico. ....	17
Ilustração 4 – A, Imagem clínica de periodontite crónica leve (PCL). B, Status radiográfico.....	19
Ilustração 5 – A, Imagem clínica de periodontite crónica moderada (PCM). B, Status radiográfico.....	20
Ilustração 6 – A, Imagem clínica de Periodontite crónica avançada (PCA). B, Status radiográfico.....	20
Ilustração 7 – Mesma profundidade de bolsa com diferentes graus de retração gengival .....	21
Ilustração 8 – Diferentes profundidades de bolsas com o mesmo grau de perda de inserção.....	22
Ilustração 9 – Mediadores inflamatórios presentes na PCL, na PCM e na PCA.....	28
Ilustração 10 – Linha de tendência da reta de calibração .....	43
Ilustração 11 – Glicose salivar entre indivíduos do grupo controlo <i>versus</i> grupo diabético .....	48
Ilustração 12 – A avaliação da glicose salivar e da glicose sanguínea (mg/dL) no grupo dos diabéticos .....	48
Ilustração 13 – Valores da glicose salivar [mg/dL] em função do sexo (grupo controlo <i>versus</i> grupo dos diabéticos).....	49
Ilustração 14 – Glicose salivar em função do tempo de duração da diabetes .....	50
Ilustração 15 – Glicose salivar [mg/dL] em relação à idade dos diabéticos.....	51
Ilustração 16 - Glicose salivar [mg/dL] em função do diagnóstico periodontal no grupo controlo e nos diabéticos. ....	52
Ilustração 17 - A avaliação da preferência pelo método de medição da glicose (método da saliva <i>versus</i> método serológico).....	53



## Índice de tabelas

Tabela 1 – Glicose plasmática [mg/dL] em jejum e a respetiva classificação de diabetes segundo a ADA (2013).....	2
Tabela 2 – Teste de Glicemia em Jejum, Teste de Tolerância à Glicose e a hemoglobina glicada.....	3
Tabela 3 – Classificação da DM segundo o Programa Nacional de Prevenção e Controlo da diabetes (2011).....	4
Tabela 4 – Alterações patológicas associadas à DMT2 (Síndrome de resistência à insulina ou síndrome X) .....	7
Tabela 5 – Critérios de diagnóstico, estabelecidos pela ADA (2013).....	9
Tabela 6 – Diagnóstico da DM pela HbA1c, segundo a Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) (2013) .....	10
Tabela 7 – Características clínicas da periodontite .....	17
Tabela 8 – Preparação das soluções do kit D-Glicose GOD-POD.....	36
Tabela 9 – Doseamento do branco e amostras de saliva para análise no nanofotómetro <i>NanoVue</i> . .....	37
Tabela 10 – Doseamento para reta de calibração. ....	37
Tabela 11 - Valor das médias de absorvência de cada concentração de glicose para a reta de calibração .....	38
Tabela 12 – Resultados dos níveis de glicose salivar nos indivíduos diabéticos. ....	45
Tabela 13 – Resultados da determinação dos níveis de glicose salivar nos indivíduos não-diabéticos.....	46
Tabela 14 - Características dos 3 <i>outliers</i> diabéticos. ....	47
Tabela 15 – O teste de chi-quadrado para o efeito da glicose salivar na periodontite. ...	52



## **Lista de abreviaturas**

- Aa: *Agreggatibacter Actinomycetecomitans*
- AAP: Academia Americana de Periodontologia
- ADA: *American Diabetes Association*
- AGE: *Advanced Glycation End-product*
- BOP: *Bleeding on Probing*
- CAL: *Clinical Attachment Level*
- DDG: *Deutsche Diabetes Gesellschaft*
- D-Glicose GOD-POD: D-Glicose Oxidase-Peroxidase
- DM: *Diabetes Mellitus*
- DMG: *Diabetes Mellitus Gestacional*
- DMT1: *Diabetes Mellitus tipo 1*
- DMT2: *Diabetes Mellitus tipo 2*
- DPP-IV: *Dipeptidyl-peptidase-IV*
- GAD65: *Glutamate Descarboxylase-65*
- HbA1c: *Glycated Hemoglobin A1c*
- HLA: *Human Leukocyte Antigen*
- ICS: Instituto de Ciências da Saúde
- IFN- $\gamma$ : *Interferon- $\gamma$*
- IgA: *Imunoglobulin A*
- IgG: *Imunoglobulin G*
- IL-1: *Interleukin-1*
- IL-1 $\beta$ : *Interleukin-1 $\beta$*
- IL-2: *Interleukin-2*
- IL-6: *Interleukin-6*
- IL-8: *Interleukin-8*
- IP: Índice de Placa

LPS: *Lipopolysaccharide*

NF<sub>κ</sub>B: *Nuclear factor-κB*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PA: Periodontite Agressiva

PC: Periodontite Crónica

PCA: Periodontite Crónica Avançada

PCL: Periodontite Crónica Leve

PCM: Periodontite Crónica Moderada

PCR: Proteína C reativa

Pg: *Porphyromonas gingivalis*

PGE<sub>2</sub>: *Prostaglandin E<sub>2</sub>*

PMN: *Polymorphonuclear leukocyte*

PS: Profundidade de Sondagem

RAGE: *Receptor for Advanced Glycation End-product*

RAR: Raspagem e Alisamento Radicular

SBA: Síndrome da Boca Ardente

SOP: *Standard Operating Protocol*

Td: *Treponema denticola*

Tf: *Tannarella forsythia*

TGJ: Teste de Glicemia em Jejum

TNF-α: *Tumor Necrosis Factor-α*

TTG: Teste de Tolerância à Glicose

UCP: Universidade Católica Portuguesa

## **INTRODUÇÃO**



# 1. INTRODUÇÃO

A diabetes é uma doença metabólica caracterizada por um aumento da glicemia sistêmica, com importantes implicações a nível da saúde e a sua prevalência tem vindo a aumentar drasticamente nos últimos anos. O aumento da prevalência da diabetes e consequentemente as complicações associadas a esta patologia implicam estabelecer estratégias para uma identificação precoce dos indivíduos em risco, de modo a melhorar o prognóstico e atrasar o aparecimento das complicações clínicas associada à diabetes (1). A monitorização da glicemia de uma forma geral é uma metodologia que implica técnicas invasivas que acabam por ser dolorosas e stressantes para o indivíduo (2). Algumas das metodologias alternativas, já estão em uso noutros países, nomeadamente nos Estados Unidos da América e incluem a análise de saliva (3-7), nalguns casos, com a avaliação da glicose sanguínea nas vias periféricas (8-11) e no fluido crevicular dos dentes (12). Enquanto a glicose a nível da saliva ainda não está bem avaliada, o teste de medição da glicemia sérica, um teste invasivo, está amplamente estudado com uma apreciação bem detalhada sobre os pontos positivos *versus* os negativos (2, 13). Deste modo, a avaliação da glicose salivar apesar de já ser usada e descrita por vários autores ainda continua a ser investigada para averiguar a fiabilidade, reprodutibilidade e as principais vantagens desta metodologia (7, 14, 15). Segundo os autores mais experientes, para além de existirem dados que comprovam que a saliva é um meio biológico onde os níveis de glicose salivar podem ser usados como indicadores dos níveis de glicose no sangue comparando indivíduos diabéticos e indivíduos saudáveis (2, 7-11, 14-17), a outra principal vantagem advém do fato de ser um método não invasivo e consequentemente indolor para o paciente (7). Além disso pode ser facilmente preservada, contornando assim os problemas associados às outras metodologias alternativas e serológicas (2, 14). Apesar de já existirem vários estudos, ainda não existe nenhum estudo realizado em Portugal que utilize o teste da saliva como uma metodologia para avaliação da glicose salivar em indivíduos diabéticos.

A relação entre a diabetes e a periodontite está amplamente estudada com claras evidências que os indivíduos diabéticos têm maior risco de desenvolver patologia oral (18), sobretudo associada à ativação de uma cascata de sinalização inflamatória induzida pela hiperglicemia (1). No entanto, a relação entre glicose na cavidade oral, medida na saliva, e os seus efeitos na periodontite ainda não está bem estudada e

segundo o nosso conhecimento, até ao momento nenhum estudo foi realizado na população portuguesa.

## 1.1. Diabetes *Mellitus*

A Diabetes *Mellitus* (DM) faz parte do grupo de doenças metabólicas e é caracterizada por uma hiperglicemia que resulta de um defeito quer na secreção de insulina, ou na própria ação da insulina sobre os tecidos periféricos ou as duas situações (8, 15, 19-21). Os fatores etiológicos da DM são vários (21) e por isso torna-se de extrema importância perceber a fisiopatologia e toda a clínica associada. Uma vez que o nível de glicose sanguínea em indivíduos saudáveis varia entre os 70 a 99 mg/dL, é a partir deste valor que se inicia a classificação do grau associado à diabetes (22). Deste modo, e segundo a *American Diabetes Association* (ADA) em 2013 estabeleceram-se diferentes classificações para esta patologia em função da concentração de glicose plasmática em jejum, que está representada na tabela 1 (22).

**Tabela 1** – Glicose plasmática [mg/dL] em jejum e a respetiva classificação de diabetes segundo a ADA (2013) (22).

CLASSIFICAÇÃO	GLICOSE PLASMÁTICA [mg/dL] EM JEJUM
Normal	70-99
Pré-diabetes	100-125
Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1 e 2	>126
Diabetes gestacional	>110

Os níveis de glicose sanguínea são feitos através da medição da sua concentração em sangue periférico, através dos testes de glicemia em jejum (TGJ) e ainda o teste de tolerância à glicose (TTG), em que a colheita é realizada 2 horas após a ingestão de 75 g de glicose (23, 24). Na tabela 2 estão representados estes testes com os valores específicos para cada categoria de diagnóstico. Por outro lado, cada vez mais se utiliza um segundo valor como indicador de uma hiperglicemia. A hemoglobina glicada (HbA1c) trata-se da medicação de hemoglobina que enzimaticamente se ligou à glicose. Portanto, quanto maior o tempo de exposição da hemoglobina à glicose maior o seu valor. Uma vez que o eritrócito, que transporta a hemoglobina, tem um tempo de vida de 120 dias, o valor que a HbA1c corresponde ao estado de hiperglicemia dos 3 meses precedentes (25).

**Tabela 2** – Teste de Glicemia em Jejum, Teste de Tolerância à Glicose e a hemoglobina glicada (23, 24, 26).

CATEGORIA	MÉTODOS/DIAGNÓSTICO		
	TGJ	TTG	HbA1c
<b>Normal</b>	< 100 mg/dL	< 140 mg/dL	<5,7 %
Anomalia de glicemia de jejum	100-125 mg/dL → <b>Risco de DM</b>	< 140 mg/dL → <b>Normal</b>	5,7 – 6,4 %
Tolerância diminuída à glicose	< 100 mg/dL → <b>Normal</b>	140-199 mg/dL → <b>Risco de DM</b>	
<b>DM</b>	≥ 126 mg/dL	≥ 200 mg/dL	≥6,5 %

TGJ = Teste de Glicemia em Jejum; TTG = Teste de Tolerância à Glicose; HbA1c = Hemoglobina glicada.

### 1.1.1. Epidemiologia e classificação

A incidência da DM tem vindo a aumentar nos últimos anos, com custos acrescidos para a saúde pública, principalmente pelas doenças associadas a esta patologia (21). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2014, 9 % das pessoas maiores de 18 anos sofrerão de DM. O aumento crescente da patologia leva que a OMS preveja que em 2030 a DM será a sétima causa de morte (27). Segundo o Programa Nacional de Prevenção e Controlo da diabetes estipulado na Norma de Direção-Geral de Saúde em 2011, a prevalência estimada da diabetes na população portuguesa correspondia a mais de 1 milhão de pessoas compreendidas entre os 20 a 79 anos de idade, ou seja 13% dos portugueses nessa faixa etária (24). O departamento da Qualidade na Saúde - Programa Nacional de Prevenção e Controlo da diabetes afirma nos termos da alínea c) do artigo 2º do Decerto Regulamentar nº 66/2007, de 29 de Maio, redação dada pelo Decreto Regulamentar nº21/2008, de 2 de Dezembro, que a principal classificação da DM é a Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DMT1) ou a Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DMT2), mas existem outras classificações tal como referido na tabela 3 (24).

**Tabela 3** – Classificação da DM segundo o Programa Nacional de Prevenção e Controlo da diabetes (2011) (24).

<b>CLASSIFICAÇÃO DA DM</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
<b>Tipo 1</b>	Diabetes <i>Mellitus</i> insulino-dependente; Diabetes comum na infância e adolescência; Associado a patologia autoimune com falência de produção de insulina.
<b>Tipo 2</b>	Diabetes <i>Mellitus</i> insulino-independente; Diabetes na vida adulta; Resistência à insulina.
<b>Diabetes <i>Mellitus</i> gestacional</b>	Diabetes durante a gravidez.
<b>Outros tipos específicos de diabetes</b>	Defeitos genéticos da célula $\beta$ ; Defeitos genéticos na ação da insulina; Doenças do pâncreas exócrino; Endocrinopatias diversas; Diabetes induzida por químicos ou fármacos.

Segundo a Norma de Direção-Geral de Saúde em 2011, a DMT1 corresponde a 5 a 10% da população de todos os casos de diabetes (24). Na maioria dos casos, raramente são obesos, associando-se muitas vezes a uma perda rápida de peso, há uma predisposição familiar e uma maior suscetibilidade ao aparecimento de outras patologias autoimunes (24). Caracteriza-se, essencialmente, por um défice de produção de insulina pelas células pancreáticas- $\beta$  e como tal são insulino-dependentes (21). São várias as complicações associadas a um controlo ineficaz da glicemia, podendo mesmo conduzir ao coma e morte (21).

A DMT2 é a forma mais frequente de diabetes e corresponde aproximadamente a 90% de todos os casos de diabetes (24). Esta está associada a vários fatores de risco, tais como o sedentarismo, a obesidade e a idade (21). Neste caso, a maioria dos indivíduos são obesos, com maior tendência para hipertensão e/ou dislipidemia. A fisiopatologia baseia-se na ausência de função da insulina, e portanto associada a uma resistência à insulina. As mulheres com Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG) prévio ou indivíduos com hipertensão ou dislipidemia têm maior predisposição para DM (21).

### **1.1.2. Diabetes *Mellitus* tipo 1 e tipo 2**

A DM classicamente define-se a diabetes como a DMT1 e a DMT2 (21, 28).

A DMT1 é definida como uma deficiência na secreção de insulina com a consequente alteração serológica associada a doenças autoimunes (24, 29). Por outro lado, a DMT2 é muito mais prevalente e resulta de uma combinação entre a resistência à insulina e/ou uma resposta inadequada na secreção de insulina (21, 24, 29). Como consequência desta alteração na secreção ou na resposta à insulina é uma hiperglicemia que pode manter-se assintomática durante vários anos (21). Na verdade, as alterações no metabolismo dos hidratos de carbono podem ser apenas visíveis quando o indivíduo é sujeito a um período de jejum ou após uma sobrecarga de glicose (21).

Em muitas situações, o controlo adequado da glicose pode ser alcançado com uma redução de peso, exercício ou com antidiabéticos orais sem a necessidade de insulina (19, 21). Noutras situações, há ainda uma libertação residual de insulina mas a insulina exógena é necessária para que ocorra um controlo adequada da glicemia (21).

#### **1.1.2.1. A Diabetes Mellitus tipo 1**

A DMT1 é um processo associado a uma destruição autoimune das células pancreáticas- $\beta$  (21, 24, 29) e consequentemente não há produção de insulina. Sendo uma doença autoimune há marcadores serológicos que podem ser quantificados, nomeadamente autoanticorpos contra as células pancreáticas- $\beta$ , contra a insulina, contra o glutamato descarboxilase-65 (GAD65) e contra as tirosinas fosfatases 1<sup>A</sup>-2 e 1<sup>A</sup>-2 $\beta$  (21). Em geral, estes autoanticorpos estão aumentados em cerca de 85 a 90% dos indivíduos quando os primeiros valores de hiperglicemia são detetados (21). A maioria destes casos ocorre em indivíduos com uma predisposição genética, ou seja em portadores de antígenos HLA e dos genes DQA, DQB e DRB (21). As suas características clínicas mais comuns são perda de peso, poliúria e polidipsia (22, 28) e podem ser descritas como início abrupto, em geral antes dos 30 anos de idade, no entanto pode ser diagnosticada em qualquer idade (24). A forma de manifestação pode ser muito rápida (particularmente em crianças) ou mais lenta (principalmente em adultos) (21). Alguns pacientes, em especial as crianças e adolescentes apresentam a cetoacidose como primeira manifestação clínica da diabetes (21). Noutras situações, em particular nos adultos existe uma função residual das células pancreáticas- $\beta$  que previne o aparecimento da cetoacidose durante vários anos (21). Estes pacientes, tal como já referido têm uma maior predisposição genética para outras doenças autoimunes como a

doença de *Graves*, tireoidite *Hashimoto*, doença de *Addison*, vitiligo, doença celíaca, hepatite autoimune, *miastenia gravis*, entre outras (21).

### **1.1.2.2. A Diabetes Mellitus tipo 2**

A DMT2 classicamente é referida como a doença não-dependente de insulina ou diabetes de aparecimento em idade adulta (24). Inicialmente, e na maior parte do tempo da duração da patologia os indivíduos com DMT2 não necessitam de insulina exógena (21). Esta forma de diabetes desenvolve-se gradualmente e na fase inicial a severidade da doença ainda não justifica a manifestação dos seus sintomas (21). Segundo a Norma Direção-Geral de Saúde em 2011 a DMT2 é caracterizada por três problemas tais como i) a resistência periférica à insulina, especificamente nas células musculares, ii) produção aumentada de glicose pelo fígado e iii) secreção de insulina pancreática alterada (24). O pâncreas produz a insulina que a resistência periférica não permite utilizar a nível celular (30). Uma vez que a insulina é a molécula que permite a entrada de glicose para dentro das células, a glicose não entra nas células, e com a acumulação desta a nível sistémico contribui para o estado de hiperglicemia (30). Como a glicose não está a ser consumida, acumulando-se exteriormente, o organismo reage com a produção de mais insulina na tentativa de controlar esta hiperglicemia. A consequência final é a situação de hiperinsulinémia (30). A diminuição da resistência à insulina pode ser alcançada pelo exercício físico e tratamento farmacológico (21). Durante o exercício físico o consumo de oxigénio pelo organismo e pelos músculos em atividade aumenta, desta maneira há uma maior sensibilidade à insulina, diminuindo a hiperinsulinémia e promovendo a entrada da glicose nos músculos (31, 32). O tratamento farmacológico, para além de atuar como sensibilizador da ação da insulina promovendo a captação da glicose pelos diferentes órgãos e tecidos, pode também ter ação de hipoglicemiante aumentando a secreção da insulina, ou de anti-hiperglicemiante diminuindo a absorção da glicose pelo intestino ou ainda de sensibilizador à ação da insulina (31). Além da hiperglicemia a DMT2 tem com frequência um grupo de desregulações a que se chamou de síndrome de resistência á insulina ou síndrome X, tal como se pode observar na tabela 4 (24).

**Tabela 4** – Alterações patológicas associadas à DMT2 (Síndrome de resistência à insulina ou síndrome X) (24).

<b>SÍNDROME DE RESISTÊNCIA À INSULINA OU SÍNDROME X</b>
Obesidade (principalmente abdominal)
Hipertensão arterial
Dislipidemia
Triglicérides elevados
Lipoproteína de alta densidade diminuída
Aterosclerose

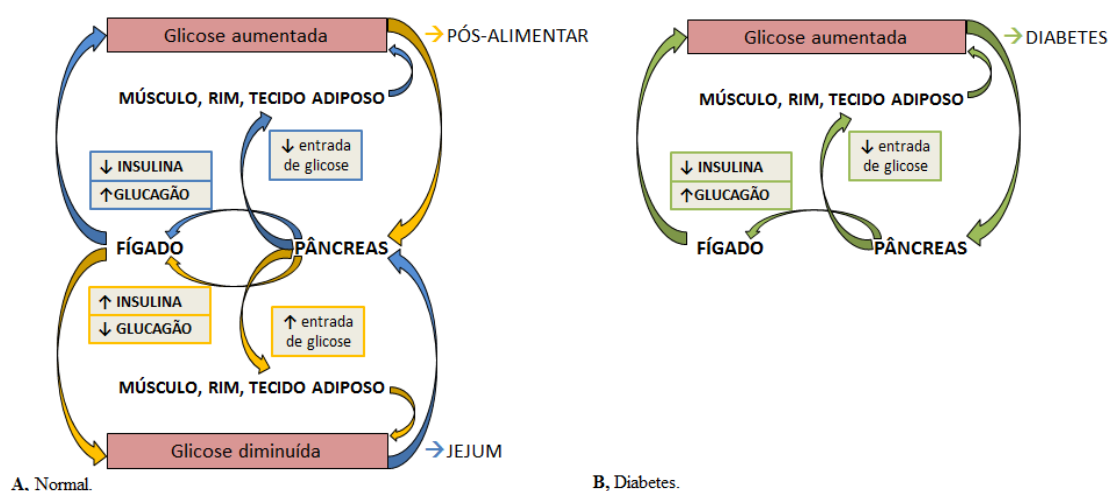
Clinicamente, a maioria destes pacientes são obesos e/ou com uma grande quantidade de massa gorda na região abdominal (24). A obesidade por si é também um fator associado ao aumento da resistência à insulina (24, 33, 34). De facto, mesmo na ausência da diabetes, o tecido adiposo aumenta a demanda por insulina, criando uma resistência à mesma e contribuindo para a hiperglicemia e consequentemente a hiperinsulinemia (33, 34).

### **1.1.3. Fisiopatologia**

Segundo Guyton et al. (2006) após a ingestão dos alimentos, os hidratos de carbono são digeridos em moléculas de glicose no lúmen intestinal (30). A glicose é absorvida para a corrente sanguínea elevando os níveis de glicose sanguínea (30). Esta elevação da glicose ocorre sobretudo após uma refeição (30). A insulina tem a função de promover o transporte de glicose para o interior da maioria das células, e portanto é uma hormona essencial para que a glicose possa estar disponível para a utilização das células (30). Quando existe um excesso de glicose e insulina plasmática, a glicose é transportada e armazenada na forma de glicogénio no interior das células hepáticas e musculares (30). Quando ocorre uma elevação da glicose há uma estimulação das células pancreáticas- $\beta$  com aumento da secreção de insulina (30). Por outro lado, no fígado há estimulação da glicogénese e glicogenólise (30). A glicogénese corresponde ao processo da entrada da glicose no fígado onde é armazenada sob a forma de glicogénio como um reservatório para o uso futuro (30). Segundo Fanelli et al. (2006) quando os níveis de glicose diminuem significativamente o organismo desencadeia uma série de mecanismos de contra-regulação, principalmente quando os níveis de glicose atingem valores de 65 mg/dl (35). Ou seja vai haver estimulação de outras células a nível do pâncreas, as células pancreáticas- $\alpha$ , e consequentemente secreção de glucagão. O glucagão é uma hormona que tem como principal ação a ativação do processo de glicogenólise, que é

responsável pela degradação do glicogénio em glicose e a sua libertação do fígado (30, 35). Outro mecanismo contra-regulador inclui o processo nomeado de gluconeogénese, com a formação de nova glicose para a corrente sanguínea, principalmente a partir do fígado (30, 36).

A glicose é portanto controlada por uma interação complexa entre o trato gastrointestinal, o pâncreas e o fígado. Na ilustração 1 encontra-se resumida a fisiopatologia da diabetes.



**Ilustração 1** – Esquema ilustrativo da fisiopatologia da libertação de insulina. **A**, Normal. **B**, Diabetes. Seta azul = jejum, seta amarela = pós-alimentar, seta verde = diabetes.

Resumidamente, quando a produção de insulina diminui ou a insulina não é utilizada adequadamente pelas células alvo está-se perante um consequente estado de hiperglicemia. Se a secreção de insulina está aumentada, os níveis de glicose no sangue podem ser muito baixos podendo levar à hipoglicemia (30).

#### 1.1.4. Diagnóstico

Como referido anteriormente a DM pode exercer efeitos negativos sobre órgãos *major* sem que o doente se aperceba da sua hiperglicemia, como acontece no caso da DMT2 que habitualmente tem uma instalação lenta e pode ficar sem diagnóstico durante anos (21). Nestas circunstâncias torna-se importante o diagnóstico precoce para a DM.

Segundo a ADA (2013) os critérios de diagnóstico incluem uma das várias opções apresentadas na tabela 5 (21).

**Tabela 5** – Critérios de diagnóstico, estabelecidos pela ADA (2013) (21).

CRITÉRIOS	VALORES
HbA1c	≥6,5%
<b>OU</b>	
Glicose no plasma em jejum	≥126 mg/dL
<b>OU</b>	
Glicose no plasma após 2h de ingestão	≥200 mg/dL (TTG com 75g de glicose)
<b>OU</b>	
Glicose ocasional no plasma de um paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicémica	≥200 mg/dL

HbA1c = Hemoglobina glicada; TTG = Teste de Tolerância à Glicose.

De um modo consensual, a medição diária da glicemia plasmática em jejum e após as refeições é o método invasivo mais usado (2, 24). Apesar do doseamento de glicose na urina ser menos comum pode ser útil em diabéticos que não conseguem fazer o método invasivo de controlo glicémico (7). Isto é particularmente útil quando a glicose no plasma é superior a 180 mg/dL (37). No entanto a avaliação da HbA1c é o método mais rigoroso e mais adequado para isto (2). Atualmente, a HbA1c é frequentemente preferida a outros testes de diagnóstico e de monitorização recomendados uma vez que não necessita de uma amostra de sangue em jejum (21). Ao eliminar a necessidade de jejum, o teste da HbA1c elimina um importante obstáculo dos exames da diabetes e pode ajudar a reduzir o número de pacientes não diagnosticados (12). A HbA1c resulta de uma reação enzimática entre a hemoglobina e a glicose, i.e., a glicação da cadeia  $\beta$  da hemoglobina e com a ligação de um resíduo de valina a uma molécula de glicose (25). Esta ligação ocorre de uma forma estável e irreversível durante o tempo de vida do glóbulo vermelho, que corresponde a 120 dias, e daí o valor obtido representar o controlo glicémico médio dos últimos 120 dias (25). Com esta modificação a estrutura e a carga positiva da hemoglobina fica alterada (25), e por isso o teste da HbA1c pode ser realizado a cada 2 a 6 meses (26). Segundo esta avaliação diferentes classificações de diagnóstico foram estabelecidas, como referido na tabela 6 (26).

**Tabela 6** – Diagnóstico da DM pela HbA1c, segundo a Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) (2013) (26).

VALORES DA HbA1c	DIAGNÓSTICO	CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO
≥ 6,5%	<b>Diabetes manifestada</b>	n.s.a.
5,7-6,4%	Risco aumentado de diabetes	Aplicar TGJ e TTG.
<5,7%	<b>Saudável</b>	n.s.a.

TGJ = Teste da Glicemia em Jejum; TTG = Teste de Tolerância à Glicose; n.s.a. = não se aplica.

O valor da HbA1c recomendado pela ADA é abaixo de 6,5 %, mas na verdade é um valor difícil de alcançar e apenas uma pequena porção destes indivíduos conseguem atingir esta meta (25). Desta maneira torna-se impossível excluir a presença de diabetes num indivíduo que apresenta a HbA1c com o valor inferior a 6,5% e conseqüentemente torna-se indispensável a aplicação do TGJ e do TTG (24). Deste modo a utilização das duas classificações, ADA e DDG, parece ser uma estratégia mais completa e que trará mais benefício para o indivíduo em risco de desenvolver diabetes.

Qualquer uma das medições feitas para a avaliação da glicemia passa sempre pela utilização de métodos invasivos. Na verdade, a maioria dos doentes faz a avaliação da glicemia ocasional utilizando dispositivos portáteis ou utilizando os dispositivos em farmácias e portanto a “picada do dedo” é uma prática frequente nestes indivíduos. Os métodos invasivos, nem sempre são bem aceites pelo doente, pelo que cada vez mais se pensa em alternativas para este controlo, tal a análise da saliva (38). A saliva é um fluido orgânico que é fácil de ser recolhido por meios não invasivos, de baixo custo e pode facilmente ser preservado (38). Vários estudos têm mostrado que os níveis de glicose salivar podem ser usados como indicadores importantes não invasivos dos níveis de glicose no sangue comparando indivíduos diabéticos e indivíduos saudáveis (7, 14, 15, 39).

### **1.1.5. Complicações**

Os processos patogénicos envolvidos no desenvolvimento e aparecimento de diabetes são vários (21). A maior causa de alta morbilidade está associada a complicações microvasculares e macrovasculares afetando múltiplos órgãos e conseqüentemente sistemas (19). A hiperglicemia crónica da diabetes está associada a um dano a longo prazo, com disfunção e falência de vários órgãos, em especial os olhos,

rim, coração, a parte cardiovascular (19, 22), e ainda uma maior suscetibilidade para as infecções (19, 22, 29).

Uma das complicações agudas e principal causa de morte desta hiperglicemia, em especial nos diabéticos tipo 1, é a cetoacidose com algumas das seguintes condições associadas: hiperventilação, respiração acidótica, hipotensão, taquicardia, hipotermia e sinais de desidratação (36). Desta maneira torna-se crucial o controlo e prevenção da cetoacidose (36). A segunda causa de morte está associada a um estado de hiperglicemia, hiperosmolaridade e desidratação, e num estágio final coma, em especial nos diabéticos tipo 2 (36). Por outro lado a hipoglicemia pode ocorrer e surgir sobretudo associado à dose de insulina incorretamente utilizada e portanto, é bastante mais comum nos diabéticos tipo 1 (36).

Além das complicações agudas, com uma exposição prolongada a estados hiperglicémicos existem também complicações crónicas, associadas às complicações microvasculares (19). A retinopatia diabética é uma das complicações a longo prazo que pode conduzir a uma perda de visão progressiva por alterações a nível da permeabilidade endotelial e a um estágio inflamatório avançado (19, 36). A nefropatia diabética é outra complicação crónica que afeta aproximadamente 40% dos diabéticos (40) com possibilidade de progressão e aparecimento de insuficiência renal crónica acompanhada por microalbuminúria (16, 19, 21, 22, 29) que pode culminar com a necessidade de terapêutica com hemodiálise (40). A neuropatia periférica associada à perda de sensibilidade periférica, parestesias, hiperestesia, dor (36) e com maior risco de desenvolvimento de úlceras nas extremidades (16, 19, 21, 22, 28, 36). As complicações neuropáticas autónomas clinicamente manifestam-se com o aparecimento de alterações gastrointestinais, geniturinários, cardiovasculares e disfunção sexual (19, 21). Os pacientes com a patologia da diabetes têm maior incidência de patologia cardiovascular, doença arterial periférica e cerebrovascular (21, 36). A hipertensão também é frequentemente encontrada nestes pacientes (21, 36).

#### **1.1.6. Manifestações orais**

Um paciente diabético, segundo Prado et al. (2013), mesmo que com ótimos cuidados de higiene oral e uma boa saúde oral tem cerca de 80% de probabilidade de manifestação das seguintes complicações orais mais frequentes: i) xerostomia (22, 28) e hipossalivação (28); ii) doença periodontal (18, 22, 28) e perda precoce das peças

dentárias (22, 28); iii) cáries (22, 28); iv) infecções bacterianas e fúngicas, como a candidíase (14, 22, 28); v) lesões na mucosa oral (28), tal como a estomatite (22, 28), queilite angular (22, 28), síndrome da boca ardente (SBA) (22), glossodinia (28) e úlceras (28); vi) dificuldade de cicatrização (22, 28) e vii) hálito cetónico (22).

A xerostomia ou boca seca está presente em 10 a 30% dos indivíduos diabéticos (22), especialmente naqueles com um pobre controlo glicémico (22, 28). A desidratação sistémica, provocada pela poliúria e polidipsia, causa um aumento no gradiente osmótico dos vasos sanguíneos em relação às glândulas salivares, diminuindo assim a secreção de saliva (28, 41). Há também uma alteração da membrana basal das glândulas salivares que interfere igualmente com a função das mesmas (22). A sensação de boca seca acaba por se tornar desconfortável para o paciente para além de provocar irritação nos tecidos da cavidade oral com sintomatologia dolorosa, favorece a evolução de outras doenças orais, tal como as doenças periodontais, lesões da mucosa e infecções (22, 28).

Segundo Prado et al. (2006), a OMS considera a doença periodontal como a sexta complicação da diabetes (22). A prevalência e severidade da doença periodontal aumentam nos pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2 (28). A periodontite é mais frequente e severa em pacientes diabéticos com pobre controlo da glicemia (28, 42). Foi verificado que os diabéticos têm um maior grau de alterações inflamatórias no periodonto em relação aos indivíduos saudáveis (28). Existem vários mecanismos que podem explicar a influência da hiperglicemia nos tecidos periodontais, tal como uma maior acumulação dos produtos finais de glicosilação (AGEs) devido à hiperglicemia crónica com alteração na função dos leucócitos polimorfonucleares (PMNs), induzindo uma maior permanência bacteriana nos tecidos e uma maior secreção de citocinas pro-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (28). Estes mecanismos vão provocar progressão da inflamação gengival seguida por destruição dos tecidos periodontais, perda do osso alveolar e perda da peça dentária (1, 28).

O aumento de bactérias presentes na cavidade oral provocado pela hiperglicemia tem também uma ação direta na formação de cáries (29). A disfunção da secreção salivar provocada pela diabetes pode ser outra explicação para o aparecimento de cáries

(28), uma vez que a presença da saliva dificulta o desenvolvimento das mesmas logo a diminuição do fluxo salivar é um fator de risco para a cárie (22).

As infecções por *candida albicans* são frequentes em pacientes diabéticos, especialmente quando apresentam uma diabetes pouco controlada, para além das infecções bacterianas, principalmente por *Streptococcus spp.* (28). A hipossalivação e o uso constante de próteses aumentam a suscetibilidade para este tipo de infecções (14, 22). Em condições normais a saliva lubrifica o rebordo alveolar sobre o qual as próteses apoiam e uma vez que há diminuição do fluxo salivar há maior trauma dos tecidos moles e conseqüente predisposição para lesões fúngicas (22). A hiperglicemia em pacientes diabéticos com pobre controlo metabólico pode influenciar a colonização patogénica de *candida albicans* (14, 22), uma vez que o seu crescimento e a adesão podem ser influenciados pela acumulação de AGEs (14, 22).

Algumas das lesões da mucosa oral podem estar diretamente relacionados com agentes infecciosos, tal a *candida albicans*, como é o caso da estomatite e da queilite angular (22, 28). A hipossalivação associada ao uso das próteses, principalmente uma prótese removível total superior, pode estar na origem da evolução de estomatite protética (22, 28). A queilite angular consiste na formação de pregas nos cantos da boca onde a saliva tende a acumular-se e criar feridas (22). Segundo Prado et al. (2013), há necessidade de controlar a DM a fim de poder proporcionar o tratamento local e sistémico para estas lesões (22). A Síndrome da Boca Ardente (SBA) é caracterizada pela sensação de queimadura sem lesões aparentes (22, 43). Os sintomas desta síndrome são restritos à cavidade oral, principalmente aos 2/3 anteriores da língua (22), mas também afeta a gengiva, lábios e mucosa jugal (43). Pode estar associada a sensação de calor, prurido, com sintomatologia dolorosa, presença de edema e ainda alterações nas papilas gustativas (22).

A dificuldade na cicatrização em indivíduos diabéticos apresenta-se tanto a nível do osso alveolar como a nível da regeneração dos tecidos moles. De acordo com Al-Maskari et al. (2011), a cicatrização oral diminuída pode estar associada a uma redução dos fatores de crescimento, presença de stresse fisiológico, redução na imunidade inata e redução na vascularização sanguínea (28).

### 1.1.7. Tratamento

De uma forma consensual, os dois objetivos primordiais para o tratamento da diabetes são: i) manter os níveis periféricos de glicose no sangue o mais próximo possível do valor considerado normal nas diferentes abordagens (ver seção 1.1.) e ii) prevenir as complicações da diabetes (30). Outros objetivos igualmente considerados importantes são: iii) garantir o crescimento e o desenvolvimento normal (das crianças com DMT1); iv) manter o peso dentro da normalidade (DMT2); v) evitar a hiperglicemia; vi) evitar a hipoglicemia; vii) prevenir a cetoacidose diabética; viii) detecção e tratamento das complicações da diabetes de longa duração (30).

Os grandes pilares do tratamento da diabetes passam por mudanças nos hábitos de vida e incluem uma dieta saudável, o exercício físico com o controle de peso e ainda o tratamento farmacológico (30).

O diabético tipo 1 depende de insulina para a sua sobrevivência e é administrada por via subcutânea (30). Quando a terapêutica farmacológica não está a ser eficiente em DMT2 passa a ser igualmente importante este controlo com insulina (44). Existem insulinas de curta ação, de ação longa, de ação intermediária e pré-misturadas que devem ser especificamente prescritas para cada indivíduo diabético (45). Como já referido anteriormente, a complicação mais comum da terapêutica com insulina é a hipoglicemia (36) que pode mesmo ameaçar a vida (30).

No diabético tipo 2 há necessidade de antidiabéticos orais e numa proporção dos indivíduos há necessidade de insulina para melhorar o controlo da glicemia (30). Standl et al. (2003) recapitularam os diferentes tipos de medicamentos de administração oral e insulina (44). Apesar de serem todos direcionados para o tratamento da DMT2 especificamente, cada um atua de maneira diferente:

- i) As biguanidas (metformina) inibem a gliconeogénese reduzindo desta maneira a produção excessiva de glicose no fígado, diminui a absorção de hidratos de carbono a nível intestinal e aumenta a captação de glicose a nível dos tecidos periféricos favorecendo a ação da insulina nos seus recetores (31, 46);
- ii) As glitazonas (rosiglitazona e pioglitazona), tal como a metformina são sensibilizadoras da ação da insulina e diminuem a gliconeogénese hepática.

Funcionam como agonistas do fator de transcrição nuclear PPAR $\gamma$  que controla a diferenciação dos adipócitos, a acumulação lipídica e a sensibilização à insulina (31, 46);

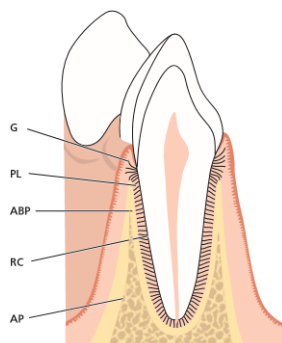
- iii) Os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase (acarbose) inibem a enzima intestinal responsável pela clivagem dos polissacarídeos em monossacarídeos. Uma vez que os polissacarídeos têm uma pobre absorção a nível do trato gastrointestinal, retarda a absorção dos hidratos de carbono e diminui assim a absorção intestinal da glicose (31, 46);
- iv) As sulfoniluréias (clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida e gliburida) e as glinidas (metiglinida – repaglinida e nateglinida) estimulam a secreção da insulina atuando diretamente nas células pancreáticas- $\beta$ . Ligam-se aos canais de potássio sensíveis ao ATP, permitindo a libertação de insulina pelas células pancreáticas- $\beta$  (31, 44, 46);
- v) Os inibidores da dipeptidil-peptidase-IV (DPP-IV) (gliptinas) inibem a degradação enzimática do peptídeo *glucacon-like-1* (GLP-1), que é uma hormona libertada para a corrente sanguínea responsável por inibir a libertação de glucagão e aumentar a libertação de insulina por estimulação da glicose (46);
- vi) As incretinas funcionam como mimetizadores do GLP-1 e consequentemente atuam a nível do pâncreas no mesmo sentido que as gliptinas.
- vii) A insulina ativa os recetores de insulina, promovendo assim a entrada da glicose para os diferentes órgãos e tecidos (31, 44).

Atualmente, a terapêutica de primeira linha é a metformina, com os melhores resultados no controlo da glicemia (31). Quando este controlo deixa de ocorrer de uma forma eficiente pode ser necessário a sua combinação com outros fármacos (46). A maioria dos profissionais de saúde opta por introduzir os inibidores da DPP-IV, as gliptinas (46). As gliptinas têm a principal vantagem de não conduzir a hipoglicemia e com baixos efeitos secundários descritos e relatados pelos doentes (46).

## 1.2. O periodonto

O termo periodonto define o conjunto dos tecidos que envolvem os dentes e que controlam o sistema de implantação dos dentes ao osso da mandíbula e da maxila (47);

ele é composto pela gengiva, ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar (48), como pode ser observado na ilustração 2.



**Ilustração 2** – O periodonto é composto pelos seguintes tecidos: Gengiva (G), Ligamento periodontal (PL), Cimento radicular (RC), e o osso alveolar (AP). O osso alveolar consiste no processo alveolar e na tábua cortical externa de osso compacto e centro esponjoso (ABP) (48).

Clinicamente é a sondagem do sulco gengival que permite ao clínico estabelecer a existência de saúde ou patologia dos tecidos periodontais (48).

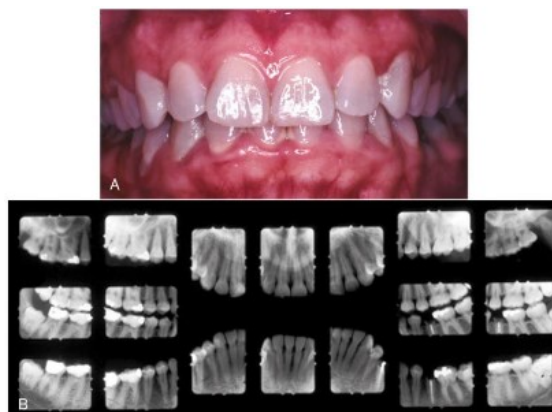
### **1.2.1. A doença periodontal**

A doença periodontal inclui as condições patológicas que afetam os tecidos circundantes dos dentes (18, 50). Segundo a Academia Americana de Periodontologia (AAP) a doença periodontal é uma infecção crônica causada por microrganismos da placa bacteriana presentes nas superfícies dentárias e no sulco gengival (47). A doença periodontal pode estar associada a doenças sistêmicas inflamatórias crônicas, tais como a diabetes e patologias cardiovasculares (51).

A progressão da doença periodontal é influenciada pelas características dos agentes patogênicos e pela própria resposta inflamatória e imune do hospedeiro aos diferentes microrganismos colonizadores. Quando aparecem os primeiros agentes patogênicos no periodonto, os tecidos moles são os primeiros afetados. Se estes agentes patogênicos persistirem nos tecidos periodontais, há envolvimento das camadas mais profundas do periodonto podendo atingir o osso (47).

A inflamação gengival, como pode ser observada na ilustração 3, clinicamente é designada como gengivite. A gengivite é uma inflamação que afeta os tecidos moles, sem haver perda do nível clínico de inserção (20) e caracteriza-se por eritema, edema e hemorragia à sondagem (47). A resposta inflamatória é o primeiro passo do mecanismo de defesa do sulco gengival (20) quando confrontado com a presença de placa bacteriana e microrganismos (47, 48). A inflamação pode ser reversível se deixar de

estar exposto aos diferentes agentes patológicos. Se persistir, o processo inflamatório pode evoluir para um estado mais agressivo, a periodontite (20).



**Ilustração 3** – **A**, Imagem clínica de gengivite. Caracteristicamente apresenta inflamação da gengiva marginal e papilar, com 1 a 4 mm de profundidade de sondagem (PS). **B**, Status radiográfico evidencia generalizada perda de nível clínico de inserção igual a 0 mm (47).

Clinicamente a periodontite é uma inflamação gengival que progride para o ligamento periodontal e para o osso alveolar provocando conseqüentemente a perda progressiva do nível clínico de inserção e perda óssea (47, 48). Quando ocorrer a destruição dos tecidos de suporte periodontal a lesão é irreversível (52).

As características clínicas da periodontite estão resumidas na tabela 7.

**Tabela 7** – Características clínicas da periodontite (47, 48).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA PERIODONTITE	
Inflamação gengival	9) Recessão gengival
Sangramento à sondagem (BOP)	10) Exposição da furca
Tecidos periodontais deixam de oferecer resistências	11) Aumento da mobilidade dentária
Perda de inserção do ligamento periodontal	12) Exfoliação do próprio dente
Perda vertical e horizontal de osso alveolar	13) Gengiva edemaciada
Cálculo supra e infra gengival	14) Alteração da cor
Supuração da bolsa	15) Ausência de papilas
Hiperplasia	16) Perda do contorno normal da gengiva

### 1.2.2. Fisiopatologia

As doenças periodontais têm uma origem multifatorial mas a placa bacteriana é o principal agente patogénico para o desenvolvimento da doença periodontal (52).

Segundo Newman (2012), a placa bacteriana é constituída por microrganismos e células epiteliais, leucócitos e macrófagos. (47). Na ausência de medidas de higiene oral durante 1 a 2 dias, há uma primeira invasão de bactérias gram+ nas superfícies dentárias e criam uma película (47, 48). Essa película acumula-se na margem cervical dos dentes e quando não é removida, pela ação mecânica, acaba por se depositar também no sulco gengival (47). A placa supragengival é constituída essencialmente por bactérias gram+ e gram- (47). Caso as medidas de higiene continuem ausentes, há uma colonização secundária de bactérias e maturação da placa (47, 48). Desta maneira, dá-se a formação e o crescimento da placa subgengival (47, 48), constituída especialmente por bactérias gram-, num ambiente estritamente anaeróbio (47, 52). Quando as bactérias entram em contacto com o sulco gengival induzem a produção de defensinas, que têm função antimicrobiana e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$  e a interleucina-8 (IL-8) a nível do epitélio juncional. A progressão da doença está relacionada com a colonização dos diferentes microrganismos tais como *Agreggatibacter Actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannarella forsythia* (Tf) e *Treponema denticola* (Td) (52).

Para além da ausência de higiene oral, existem outros fatores que têm a capacidade de modificar o equilíbrio entre a agressão das bactérias patogénicas da placa e a capacidade regenerativa dos tecidos. Há fatores locais, tais como a presença de cálculos, dentisterias defeituosas e impactação alimentar que favorecem o aumento da quantidade e patogenicidade de bactérias agressoras dos tecidos periodontais. Por outro lado, há fatores sistémicos, tais fatores hormonais, nutricionais e genéticos que atuam pela defesa diminuída do hospedeiro (47, 48).

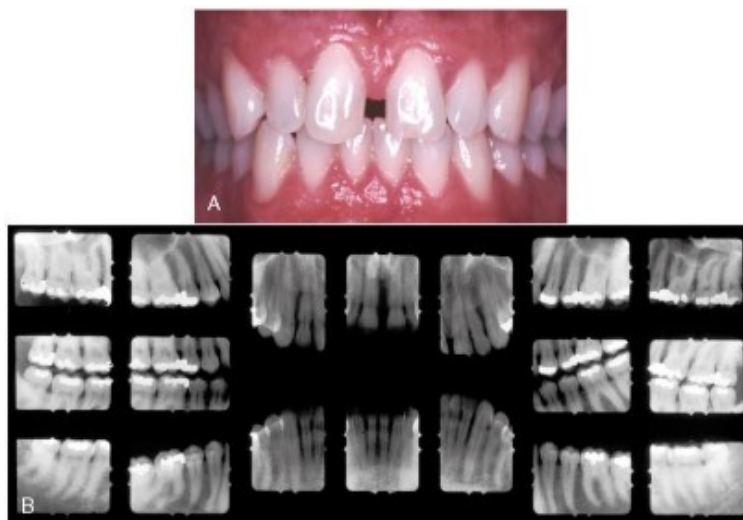
À medida que o processo inflamatório progride este torna-se crónico promovendo a degradação dos tecidos periodontais, resultando na formação da bolsa periodontal, perda de nível clínico de inserção e perda óssea (55, 56).

### **1.2.3. Classificação**

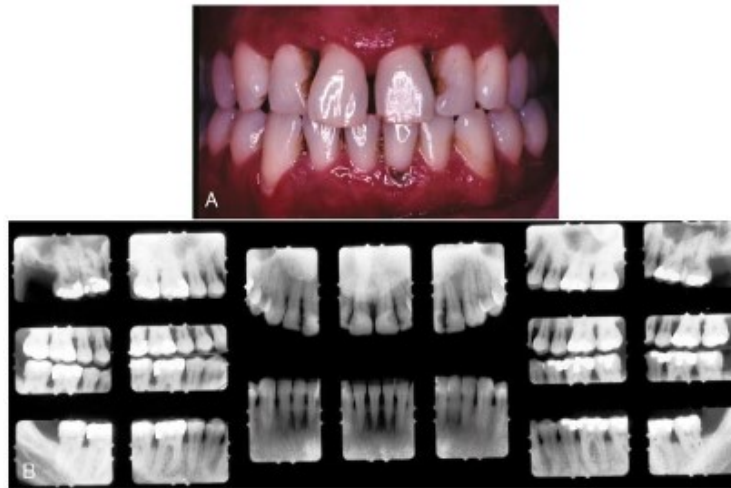
Tal como acontece nas diferentes patologia a padronização do sistema de classificação torna-se fundamental para possibilitar o correto diagnóstico, plano de tratamento e previsão do prognóstico (50).

Segundo o *International Workshop for Classification of Periodontal Diseases and Conditions* (1999), as doenças periodontais induzidas por placa podem ser classificadas em: i) Gengivite; ii) Periodontite Crônica (PC); iii) Periodontite Agressiva (PA); iv) Periodontite como manifestação de Doenças sistêmicas; v) Doenças Periodontais Necrosantes; vi) Abscessos periodontais; vii) Periodontite associada a lesões Endodônticas e viii) Condições e deformidades congênitas (50).

A PC é a periodontite mais comum que pode ser classificada, segundo a sua perda de nível de inserção (CAL) medida em milímetros, em i) leve (PCL) quando o CAL é entre 1 e 2 mm (Ilustração 4), ii) moderada (PCM) quando o CAL é entre os 3 e 4 mm (Ilustração 5) e iii) avançada (PCA) quando O CAL corresponde a igual ou superior a 5 mm (Ilustração 6) (48, 50). A PC ainda pode ser classificada de acordo com a sua extensão em i) periodontite localizada quando o total das zonas afetadas corresponde a menos de 30% e ii) generalizada quando o total das zonas afetadas corresponde a igual ou superior a 30% (47).



**Ilustração 4** – **A**, Imagem clínica de periodontite crônica leve (PCL). Caracteristicamente apresenta edema, eritema, hemorragia gengival à sondagem e supuração. **B**, Status radiográfico evidencia a perda de osso essencialmente horizontal e com 1 a 2 mm de perda do nível clínico de inserção (47).



**Ilustração 5** – A, Imagem clínica de periodontite crônica moderada (PCM). Caracteristicamente apresenta edema, eritema, hemorragia gengival à sondagem, supuração, e ainda alguma mobilidade dentária. B, Status radiográfico evidencia perda de osso horizontal e vertical, com 3 a 4 mm de perda de nível clínico de inserção (47).



**Ilustração 6** – A, Imagem clínica de Periodontite crônica avançada (PCA). Caracteristicamente apresenta edema, eritema, hemorragia gengival à sondagem com supuração, mobilidade dentária acentuada levando a migração dentária, inclinação e esfoliação dentária, e ainda formação de diastemas. B, Status radiográfico evidencia perda de osso vertical e horizontal, com perda de nível clínico de inserção igual ou superior a 5mm (47).

#### 1.2.4. Parâmetros clínicos

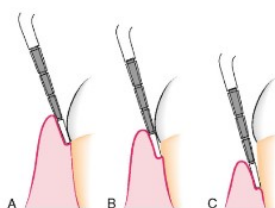
Na avaliação da presença ou ausência de periodontite há vários parâmetros que devem ser estudados, tais como i) o sangramento à sondagem (BOP), ii) profundidade de sondagem (PS), iii) nível clínico de inserção (CAL), iv) índice de placa (IP), v) número de dentes ausentes e vi) supuração (55).

#### **1.2.4.1. Sangramento à sondagem (BOP)**

Segundo Løe e Silness (1963), o BOP representa um critério inflamatório da gengiva e tecido conjuntivo e conseqüentemente é incorporado na avaliação das condições periodontais. Contudo a ausência da hemorragia nos 30 a 60 segundos após a sondagem não pode ser indicativa de saúde gengival, mas pode significar baixo risco de progressão da doença periodontal. A presença de BOP significa inflamação gengival, mas não é, por si só, indicadora de alto risco de progressão da doença periodontal. Para avaliar o sangramento à sondagem utiliza-se o índice de sangramento gengival de Ainamo e Bay (1975). Este consiste na sondagem das quatro faces de cada dente (vestibular, lingual/palatino, mesial e distal) e de seguida o número das faces que apresentaram sangramento é dividido pelo número total das faces examinadas, multiplicando o resultado por 100 para obtenção de um valor percentual (47).

#### **1.2.4.2. Profundidade de sondagem (PS)**

A PS é definida como a distância da margem gengival ao fundo do sulco gengival (quando a profundidade se mantém dentro da normalidade, ou seja entre os 0,5 a 3mm) ou à bolsa periodontal (quando profundidade é superior a 3mm e indica situação de doença periodontal) (47, 55). A profundidade de sondagem é medida em 6 pontos de cada dente, 3 pontos por vestibular (mesial, ponto médio e distal) e os mesmos 3 pontos por lingual/palatino (47). A ilustração 7 demonstra a profundidade de sondagem em 3 casos diferentes.

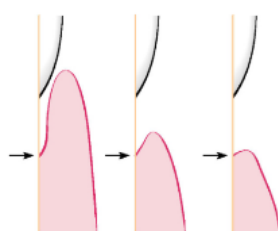


**Ilustração 7** – Mesma profundidade de bolsa com diferentes graus de retração gengival. **A**, Bolsa periodontal sem retração gengival. **B**, Bolsa periodontal de profundidade semelhante à de A, mas com algum grau de retração. **C**, Mesma profundidade de bolsa periodontal, como em A e B, mas com maior retração gengival (47).

#### **1.2.4.3. Nível clínico de inserção (CAL)**

O CAL compreende a distância da linha amelo-cementaria (CEJ = Junção entre o Cimento e o Esmalte dentário) ao fundo da bolsa periodontal (47, 55). O CAL pode ser medido em 3 pontos de cada dente, na face vestibular e na face lingual/palatina (47). As bolsas periodontais, por si só, não servem para definir a severidade da periodontite (47).

Considera-se que quanto maior for a perda óssea maior é a severidade (47). A perda óssea é determinada pela sondagem periodontal e determinação do nível clínico de inserção (47). Por isso, é fundamental registrar eventuais edemas ou recessões gengivais (ambos compreendem a distância da linha amelo-cementária à margem gengival), como representado na ilustração 8, pois podem alterar o significado da doença (47). Assim sendo, subtrai-se a medição do edema à medição da sondagem no caso de edema gengival ou adiciona-se a medição da recessão à medição da sondagem no caso de recessão gengival para se obter a perda óssea exata (55). A perda óssea pode ser confirmada, através do seu status radiográfico (47).



**Ilustração 8** – Diferentes profundidades de bolsas com o mesmo grau de perda de inserção. As setas apontam para o fundo da bolsa. A distância entre a seta e as junções amelo-cementárias permanece a mesma, a despeito das diferentes profundidades de bolsa (47).

#### **1.2.4.4. Índice de placa (IP)**

O IP é avaliado através da coloração das superfícies dos dentes com fuscina. O paciente tem de bochechar com clorohexidina para remover o excesso e em seguida, anotam-se as faces dentárias que ficam coradas devido a placa bacteriana. O total das faces coradas é dividido pelo total das faces dentárias presentes em boca e o resultado multiplicado por 100. Segundo de Quigley-Hein (1962) o significado do índice de placa bacteriana é o seguinte: 0 a 16% - ótimo estado de higiene oral, 17 a 33% - bom estado de higiene oral, 34 a 66% - mau estado de higiene oral e 67 a 100% - péssimo estado de higiene oral (47).

#### **1.2.4.5. Número de dentes ausentes**

O número de dentes ausentes tem de ser avaliado em cada paciente (47). Proença et al. (2015) explicam que em caso de PA há uma destruição rápida e intensa no periodonto, resultando em perda dentária (52). Isto também acontece na PC de grande evolução com uma perda do nível clínico de inserção e perda óssea (55).

#### **1.2.4.6. Supuração**

A supuração corresponde ao exsudato purulento provocado pela presença de neutrófilos em abundância no fluido crevicular. Para assinalar a presença ou ausência de supuração é feita pressão digital a nível da gengiva no sentido apico-coronário (47).

#### **1.2.5. Tratamento**

O tratamento da doença periodontal tem como principal objetivo a eliminação ou redução da quantidade dos agentes patogénicas presentes na cavidade oral, reduzir a PS, o BOP, a supuração e ganhar nível clínico de inserção (52). Os fatores associados que podem eventualmente interferir com a doença periodontal devem ser avaliados e incluídos no plano de tratamento. De facto, é necessário a resolução ou o controlo periódico desses fatores de maneira a poder obter o prognóstico periodontal planeado de acordo com as circunstâncias (48, 54).

Numa fase inicial, o objetivo de tratamento está associado à causa que originou a doença periodontal (47, 48). Inclusivamente torna-se fundamental a motivação e instrução de higiene oral para proceder ao tratamento periodontal propriamente dito. A raspagem e alisamento radicular (RAR) é o método convencional mais utilizado para a eliminação da placa supragengival e particularmente subgengival (29, 52). A raspagem é a remoção do cálculo e da placa que adere às superfícies dentárias e o alisamento radicular é permite suavizar as superfícies radiculares (52). Pode ser necessário incluir o uso de antibióticos locais ou sistémicos quando o tratamento mecânico não consegue remover a placa residual (47, 48, 52). Segundo alguns autores, o RAR fornece melhores resultados quando associado a um antibiótico sistémico, apresentando alguma recuperação do CAL (29, 52). A colaboração do paciente é essencial uma vez que se torna indispensável a manutenção de uma boa higiene oral e conseqüentemente o controlo da placa bacteriana (47, 48). As consultas periodontais seguintes têm como objetivo conservar a saúde dos tecidos periodontais, e por isso torna-se fundamental estabelecer procedimentos que permitam a preservação dos resultados obtidos a fim de se evitar a recidiva da doença, tal como repetir o RAR, adicionar antissépticos e antibioterapia se necessário (47, 48).

### 1.3. Periodontite e Diabetes *Mellitus*

A periodontite e a DM são doenças crônicas complexas com uma relação bidirecional (42). Ou seja, segundo dados epidemiológicos a diabetes é um fator de risco major para o aparecimento da periodontite e por sua vez a inflamação periodontal afeta de maneira negativa o controle glicêmico (18, 42). São cada vez mais crescentes os estudos que correlacionam diabetes com periodontite (11, 18, 20, 22, 28, 29, 57-60) e estudos que demonstram que o controle glicêmico é preponderante (18, 20, 22, 28, 29, 59, 60) nesta patologia. É a hiperglicemia o principal fator para o aparecimento das complicações orais, mais especificamente a periodontite (22, 28).

O ambiente hiperglicêmico dos indivíduos diabéticos reflete-se num aumento de glicose na saliva tal como já foi descrito por vários autores (6, 8, 15, 61-63). Os indivíduos diabéticos apresentam alteração na membrana basal das glândulas salivares, com aumento da permeabilidade às numerosas moléculas de glicose sanguínea (14), e portanto aumenta a concentração de glicose presente na saliva da cavidade oral. Os pacientes diabéticos com ou sem controle adequado da glicemia têm uma maior severidade da doença periodontal comparativamente com os não diabéticos (29, 59, 60). Uma das possíveis explicações para o aumento da severidade da periodontite nestes indivíduos poderá ser pelo aumento dos AGEs (29, 59). A presença de AGEs pode contribuir para um aumento da destruição do tecido da mucosa oral, essencialmente pelo aumento do stresse oxidativo, com maior produção de citocinas pró-inflamatórias, proteína C reativa, fibrinogénio, metaloproteinases da matriz extracelular e maior atividade dos osteoclastos (29, 59). Os AGEs ativam os seus recetores celulares, RAGEs, que têm um nível de expressão maior em indivíduos diabéticos e com periodontite (29). Os RAGEs encontram-se nas células endoteliais ou fagocíticas, entre outras, e dessa maneira os AGEs podem ligar-se a células tais como monócitos e macrófagos, e com a ativação do fator nuclear de transcrição – kappaB (NF $\kappa$ B), com a consequente produção de citocinas pro-inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (59). Os AGEs também se ligam aos seus recetores presentes nos fibroblastos, interferindo com a produção de colagénio que é o principal componente do tecido periodontal (29, 59). Quando os AGEs estão aumentados alteram também o metabolismo óssea inibindo a proliferação de células osteoblásticas provocando consequentemente maior suscetibilidade para a destruição do periodonto recém-formado (1, 29, 55, 56, 59) Dessa

maneira a cicatrização de feridas periodontais é afetada, atrasando-a, e há diminuição da resistência dos tecidos periodontais, tornando-os mais fracos aos ataques bacterianos (1, 29).

De um modo geral, o avanço da periodontite pela hiperglicemia, encontra-se associado a uma alteração da vascularização, alteração na expressão e função de proteínas da matriz extracelular, redução da quimiotaxia e fagocitose das células do sistema imunitário (59).

Por outro lado os monócitos e macrófagos aumentam a secreção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (29, 55, 59). Os efeitos destas alterações exprimem-se na progressão da inflamação gengival, perda do nível clínico de inserção e perda de osso alveolar (1, 28, 29, 55, 56, 59).

A hiperglicose na saliva e no líquido crevicular permitem o crescimento bacteriano (20, 29), com a produção de ácido láctico provocando assim uma redução do pH e do efeito tampão da saliva (20). Por outro lado afeta a capacidade proliferativa e secretora dos fibroblastos, impedindo a correta cicatrização dos tecidos periodontais (20).

### **1.3.1. Efeito do tratamento periodontal e do controlo metabólico nos pacientes diabéticos**

Entre os indivíduos de risco estão nomeadamente pacientes que apresentam doença periodontal moderada ou avançada (22). Para pessoas com periodontite uma consulta no médico-dentista pode ser importante para realizar o rastreio da DM, com benefícios consideráveis para os pacientes (12). Nomeadamente, conhecendo o estado da DM do paciente pode ajudar os dentistas a tomar decisões de tratamento para otimizar a saúde oral e conseqüentemente a saúde geral do mesmo (12).

Segundo Figueiredo et al. (2010), vários foram os estudos sobre os efeitos do tratamento periodontal e do controlo metabólico nos pacientes diabéticos, e verificaram que as instruções de higiene oral e RAR nos diabéticos demonstrou ter uma diminuição da inflamação sistêmica e dos níveis de citocinas circulatórias, 3 meses após o tratamento periodontal. Para além da redução dos agentes inflamatórios, quando o RAR é complementado com um antibiótico durante 14 dias observa-se uma redução na profundidade de sondagem e uma recuperação do nível de inserção (mais 1,1 mm) de

mais 0,3 mm quando comparado com o tratamento que inclui apenas o RAR (mais 0,8 mm). A primeira avaliação foi efetuada 6 semanas após o tratamento periodontal e as reavaliações foram realizados 6, 9 e 12 meses depois (29). Para além destas alterações notórias, Preshaw et al. (2012) afirmaram que após 3 a 9 meses do tratamento periodontal, o valor da HbA1c apresentava uma redução de 0,4% (18).

De acordo com Mealey et al. (2006), os diabéticos que apresentam um bom controlo metabólico têm uma resposta ao tratamento periodontal favorável, sendo similar à dos indivíduos não-diabéticos. Nas pessoas diabéticas com pobre controlo metabólico a resposta ao tratamento periodontal é menos favorável a longo prazo. De facto, apesar de terem melhorias em alguns aspetos periodontais logo após o tratamento periodontal, tal como a redução da profundidade das bolsas periodontais (PD), eles apresentam a sua recidiva mais rápido num curto espaço de tempo (59).

Portanto, o tratamento periodontal reduz a inflamação periodontal e pode restabelecer a sensibilidade à insulina por reduzir os níveis séricos de mediadores inflamatórios que causam resistência à insulina, melhorando assim o controlo metabólico (59). E desta maneira havendo controlo metabólico da diabetes, esta deixa de ser um fator de risco *major* para o aparecimento de doenças periodontais como é sugerido por vários autores (29, 59).

#### **1.4. Saliva**

A saliva é uma secreção exócrina das glândulas salivares *major*, ou seja da parótida, submandibular e sublingual, e das numerosas glândulas *minor* presentes cavidade oral (28). Em condições de saúde, os adultos produzem entre 500 a 1500 ml de saliva por dia (38) e é composta principalmente por água (99%) mas contém também eletrólitos, proteínas e enzimas (4, 38). Estas moléculas são essenciais para a prevenção do aparecimento de cáries e doenças periodontais, entre outras infeções orais (4). A saliva tem várias funções importantes como: i) controlo da digestão química do alimento pela atividade da amilase salivar; ii) ajuda na mastigação e deglutição; iii) efeito lubrificante e solvente; iv) destruição dos restos alimentares e bactérias remanescentes na cavidade oral; e v) suprimento de minerais como o cálcio e o fósforo (4). Portanto a saliva funciona como uma proteção primária da cavidade oral e na

presença de condições patológicas fica alterada a nível de qualidade e quantidade pode acabar por influenciar negativamente a saúde oral (38).

A maioria dos componentes da saliva é produzida localmente pelas glândulas salivares, outras moléculas são provenientes do líquido crevicular, das mucosas, locais de inflamação, células epiteliais e imunes, e do sangue (38). As proteínas e outras substâncias do sangue têm a capacidade de passar para a saliva através de difusão passiva ou transporte ativo e infiltração entre junções celulares (4).

#### **1.4.1. A saliva como fluido de diagnóstico**

A composição salivar permite a identificação de moléculas que podem ser consideradas como indicadores para diagnósticos clínicos uma vez que a sua composição pode ser afetada por diversas patologias sistémicas (4, 38). Algumas doenças sistémicas afetam as glândulas salivares diretamente ou indiretamente influenciando a quantidade e a composição da saliva (38). Isto acontece no caso da diabetes em que há um descontrolo metabólico com elevação dos níveis de glicose sanguínea, provocando vários efeitos adversos sobre as glândulas salivares (10). Para além dos níveis de glicose salivar serem mais elevados nos pacientes diabéticos comparado com os indivíduos não-diabéticos (1, 5, 8), existe também uma alteração a nível da produção de citocinas pro-inflamatórias na composição salivar dos diabéticos (4, 28). Segundo a literatura a proteína C reativa (PCR), o TNF- $\alpha$ , a interleucina-6 (IL-6) e o interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) são biomarcadores salivares que demonstraram correlação com os biomarcadores plasmáticos tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos diabéticos (Ilustração 9) (4). Desta maneira encontram-se aumentados na saliva em condições inflamatórias como é o caso da diabetes (4). E portanto estes níveis alterados assim como o fluxo salivar diminuído podem ser um dos principais fatores contribuidores para as doenças orais (1).

A colheita da saliva é não-invasiva e permite que várias recolhas sejam feitas no mesmo indivíduo visto que não causa stresse nem desconforto para o mesmo (5, 38). Para além disso é um fluido que é facilmente recolhido (5, 38), transportado e armazenado (38). No momento da recolha da saliva, o perfil dos indicadores presentes na mesma são específicos para aquele preciso momento pois as glândulas salivares estão continuamente a produzir saliva e os seus constituintes correspondem ao estado de saúde do indivíduo (38).



**Ilustração 9** – Mediadores inflamatórios presentes na PCL, na PCM e na PCA, adaptado de (38).

#### **1.4.2. Níveis de glicose salivar na Diabetes *Mellitus***

Uma das características da DM a nível da cavidade oral, para além de maior suscetibilidade a infeções orais, é a redução de funcionamento das glândulas salivares (1). A glicose é uma molécula pequena que pode facilmente difundir-se através da membrana semipermeável para além de que a hiperglicemia condiciona alterações na permeabilidade membranar (10, 19, 59). Deste modo, a glicose pode ser detetada na saliva, especialmente quando os níveis de glicose no plasma estão aumentados (8, 10, 64).

Vários estudos têm explorado o uso de glicose salivar para medir a glicemia. Os resultados obtidos nos estudos de alguns autores sugerem que o monitoramento do nível de glicose salivar pode ser útil para avaliar o estado glicémico de pacientes diabéticos e, potencialmente, para diagnosticar diabetes precoce. De facto, glicose salivar aumentada nos indivíduos diabéticos poderá estar associada à hiperglicemia, responsável pelos AGEs (29, 59) que acabam por interagir com outras proteínas da matriz extracelular induzindo alterações da membrana e do endotélio (10, 19, 59). Estas alterações provocam mudanças microvasculares que levam a uma maior permeabilidade da membrana e consequentemente permitem a passagem da glicose sanguínea para a saliva (19, 59). Por outro lado, outros autores defendem que a diabetes tem um efeito sobre a glicose salivar, mas rejeitam a ideia de uma relação consistente e direta entre a glicose salivar não estimulada e a glicemia (2).

Foi também descrito uma correlação direta entre os níveis de HbA1c e a glicose salivar (2, 8, 10), uma vez que a diabetes altera a permeabilidade na membrana basal das glândulas salivares e portanto justifica os altos níveis de glicose na saliva (2, 14, 15). Nos indivíduos não-diabéticos não foi descrito qualquer correlação entre os níveis de glicose salivar e a HbA1c (10).

## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

A diabetes é caracterizada por uma elevação da glicemia sistémica com importantes implicações sistémicas a nível da saúde. A saliva cada vez mais é aceite como sendo um fluido de diagnóstico para diferentes patologias. Sendo assim, os níveis de glicose salivar podem ser usados como indicadores dos níveis de glicose no sangue principalmente comparando indivíduos diabéticos e indivíduos saudáveis (2, 7-11, 14-17). Até ao momento não existem estudos portugueses que utilizem o teste da saliva como metodologia para avaliação da glicose salivar. Por outro lado, sabe-se que os indivíduos diabéticos têm maior risco de desenvolver doença periodontal (18), pela ativação de uma cascata de sinalização inflamatória induzida pela hiperglicemia (1). Mas não há estudos na população portuguesa que estabeleçam uma relação entre os níveis de glicose salivar com a periodontite.

Sendo assim, este trabalho apresenta três grandes objetivos:

1. Estabelecer uma metodologia para a determinação dos níveis de glicose salivar com a otimização de uma técnica que inclui recolha, armazenamento e processamento da amostra, com o intuito final de avaliar o valor da glicose salivar;
2. Avaliar os níveis de glicose salivar num grupo de utentes com diabetes tipo 2 (DMT2) diagnosticada e comparar com um grupo de utentes considerados controlo e portanto, saudáveis;
3. Avaliar o papel da hiperglicose salivar no diagnóstico periodontal.

No final desta tese pretende-se otimizar uma metodologia para a medição da glicose salivar e com base nesta fazer uma avaliação da glicose salivar como um método não invasivo. Por outro lado, é de prever que os níveis de glicose salivar nos diabéticos sejam superiores comparativamente aos indivíduos saudáveis (controlo). Por fim, pretende-se fazer uma avaliação comparativa entre os valores de glicose obtida na saliva e o grau de inflamação oral (periodontite).

Como objetivo final desta tese ambiciona-se a implementação de uma nova metodologia, no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) na Universidade Católica

Portuguesa (UCP) em Viseu, para a avaliação dos níveis de glicose em indivíduos diabéticos.

## **METODOLOGIA**



### **3. METODOLOGIA**

A população em estudo engloba 45 pacientes, 22 deles classificados como diabéticos tipo 2 (DMT2) e os outros 23 indivíduos são não-diabéticos (grupo controlo). A idade dos participantes é maior ou igual a 55 anos e foram divididos em dois grupos: G1 – Pacientes com DMT2, G2 – Pacientes sem DMT2 (grupo controlo). Os indivíduos selecionados para o estudo participam em atividades desportivas seniores organizadas semanalmente pela Fundação Inatel em Viseu. Um inquérito foi feito aos dois grupos a fim de se obter dados demográficos relevantes de cada paciente dos quais se destaca a idade, assim como a medicação, momento do dia em que é feita a colheita da saliva relativamente à última refeição (jejum ou mínimo 2h após o pequeno almoço). Os valores de glicose sanguínea apresentados neste trabalho correspondem à última medição realizada pelo grupo dos diabéticos, ou seja esta medição não foi realizada no preciso momento da recolha da saliva.

O objetivo primário deste estudo transversal foi avaliar os níveis de glicose salivar em pacientes diabéticos e depois identificar a correlação com a periodontite. Em relação aos aspetos éticos, foi enviada uma carta à comissão de ética da Universidade Católica Portuguesa (UCP) de Viseu para avaliação e aprovação do estudo (Anexo 1). Os pacientes selecionados para participarem neste estudo receberão informações verbais sobre a investigação. Aqueles que aceitarem participar irão ler e assinar a Declaração de Consentimento Informado (Anexo 2).

#### **3.1. Procedimento para a determinação da glicose salivar**

##### **3.1.1. Colheita, processamento e armazenamento da saliva**

A recolha da saliva foi feita de acordo com o protocolo estabelecido no *SalivaTec* do ICS da UCP de Viseu (65). Resumidamente: 1. Cada paciente bochechou com água durante 30 segundos. 2. Aguardou-se 1 minuto para regressar ao estado inicial. 3. Colocaram-se dois rolos de algodão na posição sublingual durante 2 minutos. 4. Removeram-se os rolos de algodão com luvas estéreis. 5. Introduziram-se os dois rolos de algodão dentro de um tubo de falcon estéril de 15 mL, foram armazenados em gelo até ao armazenamento final no *SalivaTec* da UCP de Viseu. 6. Centrifugaram-se as amostras a 10'000 xg durante 10 minutos a 4°C. 7. Mediu-se o volume, proteína total e

pH e fizeram-se alíquotas de 500 µL de cada amostra. 8. As amostras foram armazenadas a -80°C até à análise das mesmas.

### 3.1.2. Preparação dos reagentes

Os níveis de glicose salivar foram determinados pela metodologia de oxidação da glicose utilizando o método de D-Glicose, Glicose Oxidase-Peroxidase (GOD-POD). Este consiste num reagente que permite a determinação quantitativa da glicose na saliva.

A composição do kit D-Glicose GOD-POD consiste nas seguintes soluções: Solução 1 – *GOD-POD reagent buffer*; Solução 2 – *GOD-POD reagent enzymes*; Solução 3 – *D-Glicose standard solution*. As soluções foram preparadas como descrito na tabela 8.

**Tabela 8** – Preparação das soluções do kit D-Glicose GOD-POD.

SOLUÇÕES	PREPARAÇÃO
<b>Solução 1 - GOD-POD reagent buffer</b>	Diluir o conteúdo do recipiente em 1 L com água destilada.
<b>Solução 2 - GOD-POD reagent enzymes</b>	Dissolver o conteúdo do recipiente em aproximadamente 20 mL da solução 1 e transferir isto para o recipiente contendo o resto da solução 1. A solução obtida será o reagente GOD-POD, utilizado posteriormente para reagir com as amostras.
<b>Solução 3 - D-Glicose standard solution</b>	Nenhuma preparação.

### 3.1.3. Doseamento para as amostras e para a reta de calibração

Para obtenção dos níveis de glicose salivar, o protocolo do kit D-Glicose GOD-POD estabelecia a preparação e análise do standard para poder ser utilizado no cálculo que dá a concentração da glicose, utilizando a fórmula  $C(\text{D-glicose}) = (\Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{D-glicose standard}}) \times 1000$ . No entanto, uma vez que esse procedimento estava descrito para volumes de amostra maiores e, conseqüentemente, para um comprimento de percurso da luz (path length) de 1cm e o nanofotómetro, *NanoVue*, disponível no *SalivaTec* apresentava apenas 0,5mm, por utilizar volumes reduzidos de amostra (0,5 a 5 µL) teve de ser feita uma adaptação à metodologia. Desta maneira, procedeu-se a novos doseamentos das

amostras apropriados para a situação assim com doseamentos para a realização de uma reta de calibração.

Para preparar o branco misturou-se o reagente GOD-POD e água Mili\_Q. O branco permitiu, na etapa seguinte, estabelecer os zeros no *NanoVue* para seguidamente se poder dar início à análise das amostras de saliva. Na preparação das amostras misturou-se o reagente GOD-POD com as amostras de saliva. O volume aplicado de cada componente encontra-se na tabela 9.

**Tabela 9** – Doseamento do branco e amostras de saliva para análise no nanofotómetro *NanoVue*.

	BRANCO (µL)	AMOSTRA ( µL)
<b>GOD-POD reagente</b>	100	100
<b>Água Mili_Q (água desionizada)</b>	10	
<b>Amostra de saliva</b>		10

Os doseamentos para a realização da reta de calibração foram igualmente feitas em microtubos respeitando os volumes indicados na tabela 10. Para cada concentração de glicose foram preparadas três réplicas para obtenção da média respetiva de três absorvências.

**Tabela 10** – Doseamento para reta de calibração.

<b>Glicose [µg/mL]</b>	<b>GOD-POD reagente (µL)</b>	<b>Água Mili_Q (µL)</b>	<b>Solução 3 – D-Glicose solução <i>standard</i> 1.0 mg/mL (µL)</b>
<b>0</b>	88	22	0
<b>25</b>	88	19,3	2,7
<b>50</b>	88	16,5	5,5
<b>100</b>	88	11	11
<b>200</b>	88	0	22

As soluções obtidas foram de seguida incubadas num agitador orbital, entre 40 a 50°C durante 20 minutos permitindo assim uma correta e rápida reação química entre as soluções misturadas em cada microtubo.

Após os 20 minutos colocaram-se os microtubos em gelo de maneira a parar a reação química. A leitura no nanofotómetro, *NanoVue*, foi feita registando a absorvência a 510 nm.

### 3.1.4. Reta de calibração

Esta permite calcular valores de quantificação de glicose em amostras fazendo corresponder valores de absorvência a concentrações de glicose padrão.

Na tabela 11 estão indicadas as três absorvências obtidas das três réplicas de cada concentração de glicose pré-estabelecida, assim como a média das absorvências que permite estabelecer a linha de tendência da reta de calibração. Desta maneira, para obtenção da mesma colocam-se os valores das concentrações de glicose no eixo do XX e as médias das absorvências no eixo do YY (ver seção 4.1., Ilustração 10).

**Tabela 11** - Valor das médias de absorvência de cada concentração de glicose para a reta de calibração.

Glicose [µg/mL]	Absorvência 1	Absorvência 2	Absorvência 3	Média
0	0,003	0,004	0	0,003
25	0,039	0,031	0,041	0,039
50	0,061	0,061	0,063	0,061
100	0,089	0,086	0,086	0,086
200	0,117	0,128	0,104	0,117

### 3.1.5. Determinação dos níveis de glicose salivar

Assim como para a reta de calibração, foram anotados o valor de absorvência de cada amostra, indicado pelo nanofotómetro. Graças à equação da linha de tendência da reta de calibração ( $y = 0,0005x + 0,022$ ) foi assim possível determinar a concentração de glicose presente em cada amostra. Sendo que o  $y$  é a absorvência e o  $x$  a concentração de glicose. A concentração de glicose em µg/mL foi finalmente convertida para mg/dL de maneira a permitir uma adequada análise dos resultados (ver seção 4.2.1., Tabelas 12 e 13).

## 3.2. Registo Clínico Periodontal

O diagnóstico periodontal das amostras foi baseado no registo clínico periodontal da clínica dentária do ICS da UCP em Viseu. O registo clínico foi realizado com supervisão dos Professores da unidade curricular – CLA 1 – da área disciplinar de Periodontologia.

A cada participante do estudo foi feita uma avaliação periodontal através do preenchimento do periograma do programa *Newsoft*. Foram também realizados exames auxiliares tais como a radiografia panorâmica e o status radiográfico, para confirmação dos dados anteriores.

### **3.3. Análise estatística**

Os dados obtidos foram organizados e analisados estatisticamente com recurso ao *GraphPad Prism 6*. Todos os valores foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão e valor *p* para determinar se houve relação significativa entre os níveis de glicose salivar do grupo controlo e dos diabéticos, entre os níveis de glicose salivar e o tempo de diabetes, entre os níveis de glicose salivar e a idade dos diabéticos, e os níveis de glicose salivar e o diagnóstico periodontal.

As estatísticas dos resultados foram estabelecidas recorrendo aos seguintes testes de estatística: teste T de *Student*, estatística de ANOVA, Chi-quadrado e a método ROUT. O teste T de *Student* comparou as médias de duas amostras independentes. A estatística de ANOVA (análise de variância) comparou as médias de mais de duas amostras. O Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) foi usado para avaliar quantitativamente a relação entre o resultado obtido e a distribuição esperada para esse fator. O método ROUT permitiu fazer a análise dos valores (indivíduos) que se desviam mais da série apresentada e que consequentemente poderiam alterar a interpretação dos resultados.



## **RESULTADOS**

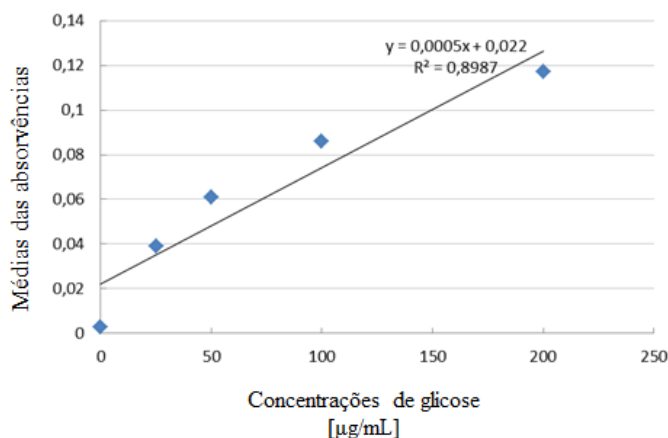


## 4. RESULTADOS

### 4.1. Otimização da técnica de doseamento de glicose salivar

Antes da quantificação da glicose salivar na amostra do estudo foi necessário recorrer à otimização da técnica de doseamento. Um dos fatores importantes neste processo é a elaboração de uma reta de calibração que correlacione os valores de absorvência com os valores de concentração de glicose. Neste estudo piloto foram avaliados 45 pacientes, 22 deles classificados como diabéticos (Anexo 4) e os outros 23 indivíduos são não-diabéticos (grupo controlo) (Anexo 5).

A ilustração 10 mostra a reta de calibração obtida durante a otimização da técnica recorrendo a uma amostra “standard” de concentração conhecida de glicose.



**Ilustração 10 – Linha de tendência da reta de calibração.** Diferentes concentrações de glicose foram preparadas [µg/ml] e as absorvências foram medidas a 510 nm. No fim estabeleceu-se uma reta de calibração, com a fórmula  $y = 0,0005x + 0,022$ . O valor de R foi igualmente calculado.

Como se pode verificar, perante diferentes concentrações de glicose me análise da amostra “standard” obtêm-se valores de absorvência correlacionáveis que são traduzíveis por uma reta, indicando por isso que as médias são lineares. A equação da linha de tendência demonstra que a linha de tendência é  $(y = 0,0005x + 0,022)$  e o valor  $R^2$  igual a 0,8987. Dado que este valor está próximo de 1, demonstra que a reta de tendência é confiável.

A adaptação da metodologia realizada com sucesso permitiu a criação de um *Standard Operating Protocol* (SOP) (Anexo 3), ou seja um protocolo de laboratório com todas as indicações e medidas corretas para a concretização de futuros estudos que tenham como objetivo a determinação dos níveis de glicose salivar.

## **4.2. Os valores de glicose salivar num grupo de indivíduos diabéticos e indivíduos saudáveis**

### **4.2.1. Determinação da glicose salivar nos indivíduos diabéticos e não-diabéticos**

Os níveis de glicose salivar dos indivíduos diabéticos e dos indivíduos não-diabéticos foram representados nas tabelas 12 e 13, respetivamente. As tabelas demonstram os valores de absorvência correspondentes à análise da saliva de cada indivíduo, e ainda os níveis de glicose salivar, na unidade [ $\mu\text{g/mL}$ ], obtidos quando utilizada a equação da linha de tendência da reta de calibração, como descrito na seção 3.1.5. Os níveis de glicose salivar na unidade [ $\text{mg/dL}$ ] foram os valores utilizados para o estudo.

Os indivíduos diabéticos apresentavam valores da glicose salivar entre os 13,6 e 88  $\text{mg/dL}$  (Tabela 12). Já o intervalo dos valores da glicose salivar nos indivíduos não diabéticos situavam-se entre os 5,6 e 18,4  $\text{mg/dL}$  (Tabela 13).

**Tabela 12** – Resultados dos níveis de glicose salivar nos indivíduos diabéticos.

<b>Identificação do diabético</b>	<b>Absorvência a 510nm</b>	<b>Glicose salivar [µg/mL]</b>	<b>Glicose salivar [mg/dL]</b>
1.	0,091	226	22,6
2.	0,101	246	24,6
3.	0,064	172	17,2
4.	0,058	160	16
5.	0,076	196	19,6
6.	0,269	582	58,2
7.	0,046	136	13,6
8.	0,111	266	26,6
9.	0,091	226	22,6
10.	0,071	186	18,6
11.	0,1	244	24,4
12.	0,048	140	14
13.	0,053	150	15
14.	0,113	270	27
15.	0,085	214	21,4
16.	0,053	150	15
17.	0,418	880	88
18.	0,278	600	60
19.	0,146	336	33,6
20.	0,087	218	21,8
21.	0,051	146	14,6
22.	0,067	178	17,8

**Tabela 13** – Resultados da determinação dos níveis de glicose salivar nos indivíduos não-diabéticos.

<b>Identificação dos não-diabéticos</b>	<b>Absorvência a 510nm</b>	<b>Glicose salivar [µg/mL]</b>	<b>Glicose salivar [mg/dL]</b>
1.	0,028	100	10
2.	0,024	92	9,2
3.	0,042	128	12,8
4.	0,054	152	15,2
5.	0,011	66	6,6
6.	0,041	126	12,6
7.	0,042	128	12,8
8.	0,006	56	5,6
9.	0,027	98	9,8
10.	0,045	134	13,4
11.	0,038	120	12
12.	0,022	88	8,8
13.	0,03	104	10,4
14.	0,044	132	13,2
15.	0,027	98	9,8
16.	0,07	184	18,4
17.	0,028	100	10
18.	0,046	136	13,6
19.	0,035	114	11,4
20.	0,032	108	10,8
21.	0,05	144	14,4
22.	0,032	108	10,8
23.	0,02	84	8,4

#### 4.2.2. Correlação da glicose salivar entre os indivíduos diabéticos e não-diabéticos

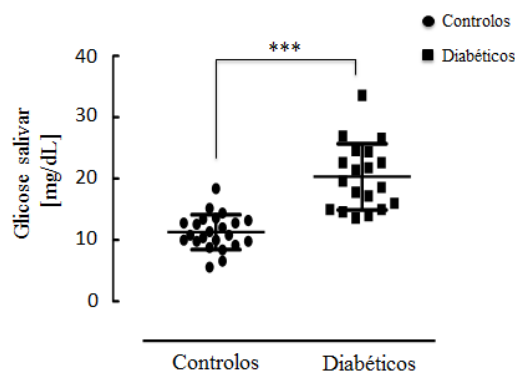
Dos 22 diabéticos estudados, apenas 19 vão ser integrados nos gráficos dos resultados do estudo, uma vez que 3 dados dos indivíduos diabéticos foram excluídos por terem sido identificados como sendo *outliers* pela análise do método ROUT. Qualquer um dos 3 indivíduos diabéticos excluídos apresentaram valores de glicose salivar bastante elevados (58,2 ml/dL, 60 ml/dL e 88 ml/dL) e que, conseqüentemente, se destacam dos valores da glicose salivar dos restantes diabéticos. Qualquer um destes indivíduos apresenta um longo tempo de evolução da diabetes (mais que 8 anos), e um valor de HbA1c na ordem dos 6%. Para além disso um dos indivíduos classificado como diabético (diabético 17, ver tabela 14) refere não tomar qualquer medicação. As características desses três diabéticos foram descritas na tabela 14. Do grupo controlo não foram excluídos nenhuns indivíduos.

Tabela 14 - Características dos 3 *outliers* diabéticos.

Identificação do diabético	Glicose salivar [mg/dL]	Glicose sanguínea [mg/dL]	HbA1c	Medicação para Diabetes	Tempo de duração de Diabetes
6.	58,2	129	6,00%	Metformina	8 anos
17.	88	110	n.d.	sem med.	10 anos
18.	60	106	6,60%	Metformina	25 anos

n.d. = não determinado; sem med. = sem medicação.

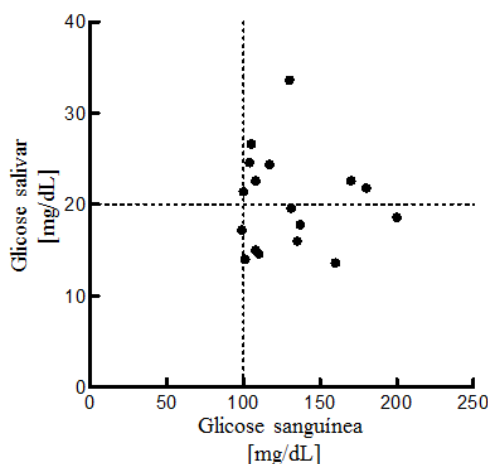
Excluídos os *outliers*, os valores de glicose salivar foram avaliados pelo método descrito na seção da metodologia (Anexo 3) constatando-se que os indivíduos saudáveis (controlo) apresentavam uma glicose salivar de  $11,3 \pm 0,6$  mg/dL, enquanto o grupo diabético apresentava uma glicose salivar de  $20,3 \pm 1,2$  mg/dL (Ilustração 11).



**Ilustração 11 – Glicose salivar entre indivíduos do grupo controle versus grupo diabético.** A avaliação da glicose salivar foi realizada em dois grupos de estudo. Os indivíduos saudáveis (controle) e os indivíduos com o diagnóstico (diagnóstico de DMT2). O valor da glicose salivar nos indivíduos diabéticos foi significativamente superior aos indivíduos saudáveis. \*\*\* $p < 0.001$ , teste *t-student*, quando comparado com o grupo controle.  $n=42$ .

### 4.2.3. Relação entre os valores de glicemia sanguínea e a glicose salivar nos diabéticos

Uma vez que a diabetes se caracteriza por uma hiperglicemia, tentamos correlacionar os dados da glicemia sanguínea fornecida pelos pacientes diabéticos e a glicose salivar por nós determinada. Dos 19 indivíduos diabéticos foram excluídos dois que não medem a glicose sanguínea. Os indivíduos controle não foram incluídos nesta análise. A ilustração 12 representa uma relação entre a concentração da glicose salivar e da glicose sanguínea nos indivíduos diabéticos.



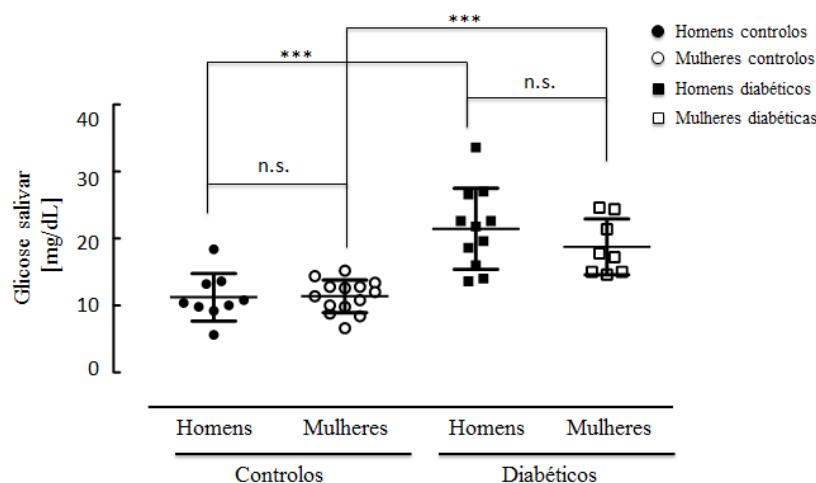
**Ilustração 12 – A avaliação da glicose salivar e da glicose sanguínea (mg/dL) no grupo dos diabéticos.** O valor da glicose sanguínea usada foi fornecido pelos indivíduos e corresponde ao último valor obtido por estes. O valor de 100 mg/dl é o *cutoff* usado para diferenciar dos diabéticos e não diabéticos. O valor de glicose sanguínea (eixo XX) foi representado em função do valor da glicose obtida na saliva (eixo YY). Considerou-se 20,4 mg/dl o valor médio dos indivíduos diabéticos na nossa população.  $n=19$

É possível verificar que todos os valores da glicose sanguínea se encontram no quadrante de glicemia sanguínea superior a 100 mg/dL, sendo o valor pelo qual se inicia

a classificação da diabetes (21). A média dos níveis de glicose salivar dos indivíduos diabéticos é de 20,2 mg/dL e a média dos níveis de glicose sanguínea é de 129,1 mg/dL. Nove dos indivíduos diabéticos têm valores entre os 100 e 129,1 mg/dL, com os níveis de glicose salivar que variam dos 14 aos 26,6 mg/dL. Os restantes 8 indivíduos diabéticos têm valores superiores à média de glicose sanguínea apresentando níveis de glicose salivar entre os 13,6 e os 33,6 mg/dL.

#### 4.2.4. Correlação entre a glicose salivar e o género

O valor da glicose salivar em função do sexo e da presença ou não de patologia da diabetes foi também estudada (Ilustração 13).



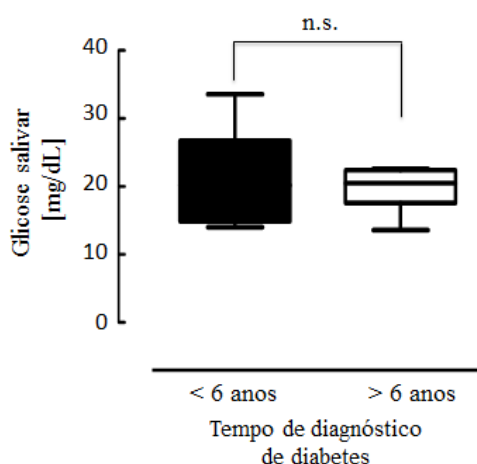
**Ilustração 13 – Valores da glicose salivar [mg/dL] em função do sexo (grupo controlo versus grupo dos diabéticos).** A glicose salivar foi medida nos dois grupos de estudo e a relação entre glicose salivar e o sexo em cada um dos grupos foi igualmente avaliada. Não existe correlação estatisticamente significativa entre o valor de glicose salivar e o género. O valor da glicose salivar nos indivíduos do sexo masculino do grupo dos diabéticos e do grupo controlo foi significativo, \*\*\*p < 0.001, ANOVA. O valor da glicose salivar nos indivíduos do sexo feminino do grupo dos diabéticos e do grupo também foi significativo, \*\*\*p < 0.001, ANOVA. n=42

No grupo controlo, os homens apresentavam uma média de glicose salivar próxima (11, 2 ± 3,6 mg/dL) à das mulheres (11, 4 ± 2,4 mg/dL). O intervalo dos valores da glicose salivar dos homens encontra-se entre os 5,6 e 18,4 mg/dL. Já o intervalo dos valores da glicose salivar das mulheres situa-se entre os 6,6 e 15,2 mg/dL. No grupo dos diabéticos, os homens demonstraram ter uma média de glicose salivar ligeiramente superior à das mulheres (21,5 ± 6,1 mg/dL versus 18,7 ± 4,2 mg/dL). O intervalo dos níveis de glicose salivar dos homens está entre os 13,6 e 33,6 mg/dL, e o das mulheres entre os 14,6 e 24,6 mg/dL. A diferença entre a concentração de glicose salivar entre os homens e mulheres do grupo controlo não é significativa. O mesmo acontecendo com a diferença de concentração de glicose salivar entre os homens e mulheres diabéticos. No

entanto, verifica-se que existe uma diferença estatisticamente significativa da concentração de glicose salivar: i) entre os homens do grupo controlo e os homens diabéticos ( $p < 0.001$ ); ii) entre as mulheres do grupo controlo e as mulheres diabéticas ( $p < 0.001$ ).

#### 4.2.5. Correlação entre a glicose salivar nos diabéticos em função do tempo de diabetes e da idade dos pacientes

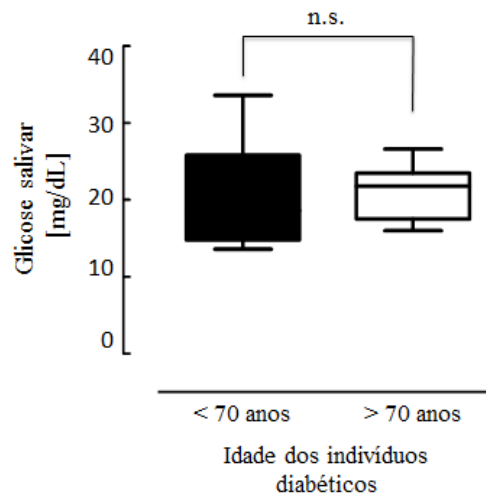
Por outro lado, quisemos perceber se existiria alguma relação entre o valor de glicose salivar e o tempo de duração da diabetes. Neste estudo optou-se por fazer a divisão em dois grupos: diabéticos com diagnóstico há mais de 6 anos ou diabéticos com diagnóstico há menos de 6 anos (8).



**Ilustração 14 – Glicose salivar em função do tempo de duração da diabetes.** A avaliação da glicose salivar foi realizada em indivíduos com o diagnóstico de diabetes há menos de 6 anos e em indivíduos com o diagnóstico de diabetes há mais de 6 anos. O valor da glicose salivar nos indivíduos diabéticos em função da duração da diabetes não foi significativo. n.s – não significativo, teste *t-student*,  $p > 0.05$ .  $n = 19$ .

Os nossos resultados demonstram que não há qualquer relação entre o valor de glicose salivar e o tempo de duração da diabetes (Ilustração 14). O gráfico demonstra que os diabéticos há menos de 6 anos apresentam uma média de glicose salivar semelhante ( $21,1 \pm 2,2$  mg/dL) à dos diabéticos há mais de 6 anos ( $19,5 \pm 1,0$  mg/dL).

O valor da glicose salivar em função da idade dos pacientes diabéticos especificamente foi também avaliada (Ilustração 15).



**Ilustração 15 – Glicose salivar [mg/dL] em relação à idade dos diabéticos.** A avaliação da glicose salivar foi realizada em indivíduos com o diagnóstico de diabetes com menos de 70 anos de idade e os indivíduos com o diagnóstico de diabetes com mais de 70 anos de idade. O valor da glicose salivar nos indivíduos diabéticos não foi significativo. n.s. – não significativo, *teste t-student*. n=19.

Os diabéticos com menos de 70 anos de idade apresentavam uma média de glicose salivar ligeiramente inferior ( $20,2 \pm 2,3$  mg/dL) em comparação com a glicose salivar dos diabéticos com mais de 70 anos de idade ( $21,2 \pm 1,2$  mg/dL). O intervalo da glicose salivar dos diabéticos com menos de 70 anos de idade encontra-se entre os 13,6 e 33,6 mg/dL; o intervalo da glicose salivar dos diabéticos com mais de 70 anos de idade está entre os 16,0 e 26,6 mg/dL. A diferença entre a concentração da glicose salivar nos diabéticos com menos de 70 anos de idade e nos diabéticos com mais de 70 anos de idade não é estatisticamente significativa ( $p = 0.7086$ ).

#### 4.2.6. O efeito da glicose salivar na periodontite

O efeito da glicose salivar na periodontite foi também avaliado. A ilustração 16 representa a relação entre glicose salivar e periodontite. Para esta análise foram excluídos três indivíduos saudáveis desdentados totais e um indivíduo diabético desdentado total, sendo que o número da amostra do grupo controlo é de 20 e a dos diabéticos é de 18. Nesta avaliação teve-se em consideração a existência ou não de periodontite crónica avançada (sem PCA *versus* com PCA) em dois grupos: diabéticos e não-diabéticos. A hipótese colocada ( $H_0$ ) foi: a presença de diabetes influencia a existência de periodontite?

**Tabela 15 – O teste de chi-quadrado para o efeito da glicose salivar na periodontite.**

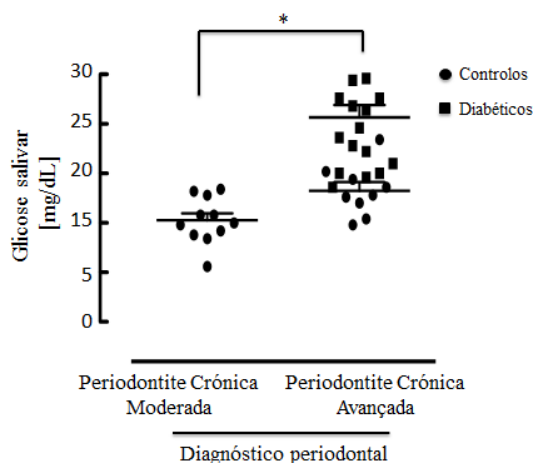
	Sem PCA			Com PCA			Total
	Obs.	Exp.	Chi- $\chi^2$	Obs.	Exp.	Chi- $\chi^2$	
Diabéticos	0	(5,21)	[5,21]	18	(12,79)	[2,12]	18
Não-diabéticos	11	(5,79)	[4,69]	9	(14,21)	[1,91]	20
Total	11			27			38

O valor do chi-quadrado é de 13,9333. O valor  $p$  é de 0,000189. Este resultado significa  $p < 0,05$ .

PCA = Periodontite Crónica Avançada; Obs. = Valor observado; Exp. = Valor esperado; Chi- $\chi^2$  = Valor do Chi-quadrado.

Onze pessoas do grupo controlo (grupo dos indivíduos não-diabéticos) não apresentavam periodontite avançada (sem PCA), e 9 desse grupo apresentavam periodontite avançada (com PCA). No grupo dos diabéticos todos apresentavam PCA (Tabela 15). A diferença entre o grupo controlo e os diabéticos na média da glicose salivar em relação ao diagnóstico periodontal é estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Quando aplicado o teste de chi-quadrado, representado na tabela 15, verifica-se que o valor de  $p < 0,05$ .

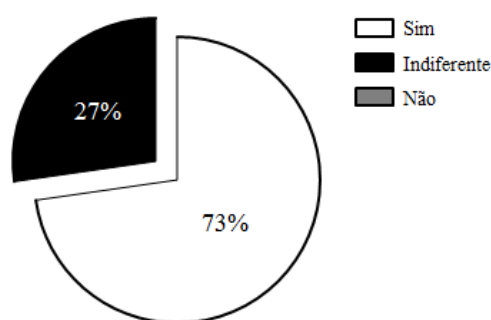
Onze pessoas do grupo controlo (grupo dos indivíduos não-diabéticos) apresentam periodontite crónica moderada (PCM) com uma média de glicose salivar de  $10,3 \pm 2,3$  mg/dL. O respetivo intervalo encontra-se entre os 5,6 e 13,4 mg/dL. As restantes 9 pessoas do grupo controlo têm periodontite avançada (PCA) com uma média de glicose salivar de  $13,2 \pm 2,6$  mg/dL. O respetivo intervalo está entre os 9,8 e 18,4 mg/dL. Os diabéticos apresentam exclusivamente periodontite avançada (PCA) com uma média de glicose salivar de  $20,3 \pm 5,4$  mg/dL e com um intervalo entre os 13,6 e 33,6 mg/dL.



**Ilustração 16 - Glicose salivar [mg/dL] em função do diagnóstico periodontal no grupo controlo e nos diabéticos.** A avaliação da glicose salivar foi realizada em indivíduos com o diagnóstico de Periodontite Crónica Avançada (PCA) e em indivíduos com o diagnóstico de Periodontite Crónica Moderada (PCM). O valor da glicose salivar nos indivíduos com o diagnóstico PCA foi significativo,  $*p < 0,001$ , teste *t-student*.  $n=38$ .

#### 4.2.7. Avaliação do grau de satisfação dos pacientes diabéticos e a técnica de medição de saliva não invasiva

Por fim, quisemos saber o grau de satisfação dos pacientes diabéticos relativamente à metodologia realizada. A ilustração 17 representa a preferência dos diabéticos pelo método de medição da glicose através saliva em alternativa ao teste da glicose sanguínea. 16 diabéticos (73%) manifestarem preferência pelo método da saliva e 6 diabéticos (27%) não tinham preferência por nenhuma das metodologias. Nenhum dos diabéticos questionados preferia o método da glicemia serológica.



Total dos diabéticos = 100%

**Ilustração 17 - A avaliação da preferência pelo método de medição da glicose (método da saliva *versus* método serológico).** Foram questionados telefonicamente os 22 diabéticos do estudo para avaliar a preferência relativamente à metodologia para avaliação da glicose. n=22.



## **DISCUSSÃO**



## 5. DISCUSSÃO

A diabetes é claramente um dos grandes desafios da medicina e dos profissionais de saúde. Esta é caracterizada por um aumento da glicemia sistémica. A monitorização corporal dos níveis de glicose torna-se assim essencial, de modo a melhorar a sua qualidade de vida e a retardar o aparecimento das complicações associadas à diabetes.

O trabalho apresentado nesta tese permitiu, antes de mais, o desenvolvimento de uma metodologia, original, para a avaliação dos níveis de glicose na saliva e espera-se que a mesma seja introduzida na prática na escola de Medicina Dentária do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Católica Portuguesa (UCP), em Viseu. Pretendeu-se ainda demonstrar que esta análise era igualmente sensível para a determinação da glicose em indivíduos diabéticos e menos invasiva do que os métodos habituais. Por outro lado, demonstrou-se, tal como esperado, que os diabéticos apresentam concentrações de glicose salivar superior aos indivíduos não diabéticos (grupo controlo). No entanto, os valores da concentração da glicose salivar em função do sexo, idade e tempo de diabetes não são significativamente diferentes. Uma vez que a periodontite é um estado inflamatório da mucosa oral (28) nomeadamente da gengiva, e uma vez que a diabetes está associada a um aumento dos parâmetros inflamatórios (21, 28) quisemos também avaliar a relação entre os níveis de glicose e o estado de periodontite. Foi constatado que níveis maiores de glicose salivar, principalmente em diabéticos, se traduzem num estágio mais avançado de periodontite.

### **Otimização da técnica de doseamento de glicose salivar**

A monitorização da glicémia plasmática, apesar de aceite por todos os indivíduos por falta de alternativas, é uma metodologia invasiva que se torna desconfortável para o paciente. Deste modo, a indústria farmacêutica procura novas tecnologias que permitam ultrapassar a desvantagem associada à medição da glicemia serológica. O teste da glicose na saliva torna-se assim um teste importante e de relevância clínica, uma vez que é um teste não invasivo. Já existem analisadores semiautomáticos que permitem avaliar a concentração da glicose salivar pela metodologia de oxidação da glicose (1, 5-9, 15, 16). Neste estudo foi utilizada uma metodologia baseada num reagente químico que reage com os diferentes componentes orgânicos da saliva, nomeadamente com a

glicose e permite assim uma posterior leitura das concentrações de glicose presentes em cada amostra. De uma forma resumida, inicialmente ocorre a oxidação da D-glicose pela ação da glicose oxidase (GOD) transformando-a em ácido glicónico e peróxido de hidrogénio. De seguida, a peroxidase (POD) catalisa o peróxido de hidrogénio, o ácido p-hidroxibenzoico e 4-aminoanítipirina dando origem ao complexo de coloração vermelha conhecido por quinoneimina (66). Esta metodologia foi validada por Bhumika et al. (2015), que afirmaram que os níveis de glicose salivar obtidos através da metodologia não invasiva podem ser usados para o diagnóstico da diabetes e para comparação com outros fluidos (22). Contudo, o protocolo do kit D-Glicose GOD-POD teve de ser adaptado ao nosso estudo, em função do equipamento disponível no *SalivaTec*. O *SalivaTec* é um laboratório de pesquisa estabelecido no ICS da UCP de Viseu, dedicado à análise da saliva. De facto, para analisar as amostras foi necessário recorrer ao nanofotómetro, *NanoVue*, que permite a leitura de micro-volumes. Desta maneira, os doseamentos sugeridos pelo protocolo tiveram de ser alterados, assim como todo o procedimento que envolvia a determinação dos níveis de glicose salivar das amostras. A adaptação foi concluída com sucesso, de maneira que se optou por redigir um *Standard Operating Protocol* (SOP) para futuros estudos com o objetivo de analisar glicose salivar nas mesmas condições laboratoriais, permitindo a utilização de pequenas quantidades de amostras, o que poderá ser uma mais valia em relação a outros métodos.

### **Glicose salivar nos indivíduos diabéticos e não-diabéticos**

A glicose é uma pequena molécula que rapidamente se difunde através da membrana celular semipermeável, e deste modo facilmente pode ser detetada nos diferentes fluidos, dos quais destaca-se a saliva (8, 10, 64). No nosso trabalho fomos avaliar as alterações nos níveis de glicose presentes na saliva entre os dois grupos de estudo: os controlos e os indivíduos diabéticos. Os nossos resultados indicam que os níveis de glicose salivar obtidos são superiores nos diabéticos quando comparado com os não-diabéticos (Ilustração 11). As médias que obtivemos neste trabalho foram semelhantes a outros estudos realizados (3, 8, 15). Isto demonstra que a metodologia usada neste estudo para determinar os níveis de glicose salivar é viável e fíavel e portanto é uma metodologia robusta. O aumento da glicose salivar nos indivíduos diabéticos poderá estar associada ao facto da condição de hiperglicemia contribuir, por um lado, para uma maior permeabilidade da membrana (8, 10, 64) e, por outro lado, estar associada à formação dos AGEs (29, 59), que acabam por interagir com outras

proteínas da matriz extracelular induzindo alterações da membrana plasmática e do endotélio (10, 19, 59). Estas alterações provocam alterações microvasculares que tornam esta membrana mais permeável e, conseqüentemente permitem a passagem da glicose dos vasos sanguíneos para a saliva (19, 59). Estas alterações da permeabilidade são particularmente evidentes ao nível das glândulas salivares e portanto com uma maior passagem de glicose para a saliva. Na verdade, pensa-se que qualquer alteração a nível da permeabilidade dos vasos sanguíneos pode induzir um aumento do transporte de glicose para a saliva (3, 64).

A principal diferença que existe entre os resultados do nosso estudo e os outros estudos citados anteriormente (3, 8, 15) é o número relativamente pequeno da nossa amostra. Para além disso, no presente estudo a maioria dos indivíduos apresenta uma média de idades superior a 59 anos. Deste modo, seria importante continuar o trabalho com o aumento da amostragem e, com uma maior heterogeneidade de idade, para ter um grupo mais representativo da população geral, especialmente no caso do grupo controlo. Uma parte dos trabalhos publicados fez a colheita da saliva em jejum (1, 6, 15, 16), já no trabalho que apresentamos todas as pessoas que participaram no trabalho tinham tomado o pequeno-almoço no mínimo 2 horas antes da recolha da saliva. Sabe-se que a dieta influencia os níveis de glicose no sangue, e deste modo o fato de estar em jejum de 8 horas no momento da recolha, garante que o indivíduo já metabolizou o alimento ingerido. No entanto, e uma vez que todos os indivíduos no nosso estudo estão nas mesmas condições consideramos que esta variável é igual para todos os indivíduos.

Neste estudo optou-se por eliminar 3 indivíduos diabéticos, identificados como *outliers* pelo método ROUT, por apresentarem níveis de glicose salivar que se destacaram dos outros valores dos diabéticos. Contudo ao analisar as informações adicionais destes 3 elementos percebeu-se que existem outros fatores que podem ter interferido neste aumento dos valores da glicose salivar (tabela 14). O indivíduo diabético 18 que apresentou 60,0 mg/dL de glicose salivar tem o diagnóstico de diabetes há mais de 25 anos e um valor da HbA1c é de 6,6%. O *outlier* 6, com 58,2 mg/dL tem a patologia da diabetes há 8 anos, glicose sanguínea em jejum de 129 mg/dL e apresenta um valor de HbA1c de 6,0%. Por outro lado, o *outlier* 17 com 88,0 mg/dL é considerado pré-diabético, não toma medicação para a diabetes e é apenas controlado através de uma dieta. Muito provavelmente será um doente com um mau controlo da patologia da diabetes. Apesar dos valores de glicemia sanguínea estarem dentro dos

valores considerados aceitáveis (110 mg/dL), cada vez é mais aceite que o controlo da diabetes deverá ser feito pela HbA1c, uma vez que representa os valores da glicemia correspondentes aos últimos 2 a 4 meses. Uma vez que o controlo farmacológico não está a ser feito, é legítimo questionarmo-nos se realmente está a ser realizado um controlo adequado da doença. Logo torna-se mais difícil controlar os valores da diabetes deste tipo de indivíduos quando não são medicados e dependem apenas da própria força de vontade. Estes 3 *outliers* podem de facto ser considerados valores muito distintos nesta população em questão e por isso um aumento do grupo de estudo permitirá avaliar se realmente estes *outliers* são verdadeiros ou se não representam doentes com um controlo de diabetes inadequado. Apesar de estes indivíduos terem sido excluídos do estudo presente, valores nesta gama de valores já foram descritos por Patel et al. (2).

### **Relação entre a glicemia sanguínea e a glicose salivar nos diabéticos**

A relação entre glicose salivar e sanguínea foi um dos pontos que se pretendeu analisar neste trabalho. Neste caso em concreto, os valores da glicemia sanguínea e salivar parecem sugerir uma possível relação entre as duas (Ilustração 12) mas tal correlação não pode ser aferida com rigor uma vez que os valores não correspondem a uma avaliação simultânea dos valores de glicose sanguínea e salivar, como já foi referido na metodologia. Consideramos portanto, que a principal crítica ao estudo apresentado nesta dissertação está aqui patente. A correlação estreita entre a glicose salivar e a sanguínea ainda não está bem estabelecida uma vez que existem autores que concluem uma ausência de correlação entre estes dois parâmetros (9, 67). No entanto, outros demonstraram que os níveis de glicose salivar estão diretamente relacionados com os níveis de glicose sanguínea (8, 15), e existem ainda outros estudos que demonstram esta correlação mas apenas em indivíduos diabéticos (6, 61-63). Há ainda grupos como, Karandeep et al. (2015) que em função dos valores obtidos entre a glicose capilar e a glicose salivar conseguiram estabelecer uma equação de correlação entre estes dois parâmetros, em que com o valor da glicose salivar conseguem prever o valor da glicose sanguínea, sendo mais uma indicação que os níveis de glicose salivar são indicadores fiáveis para a determinação dos valores de glicose sanguínea (33).

### **A glicose salivar e o género**

A glicose salivar em função do sexo dos participantes foi igualmente analisado neste trabalho. Os nossos resultados demonstraram que não existe relação entre o valor da

glicose na saliva em função do género (Ilustração 13). Este resultado vai de encontro com outros autores que também não demonstraram diferenças entre os níveis de glicose sanguínea e o sexo (8, 64, 68). De facto, ao comparar os homens e as mulheres do grupo controlo ambos tinham uma média de glicose salivar muito próxima uma da outra. Isto também aconteceu no grupo dos diabéticos, no entanto a média da glicose salivar dos homens diabéticos ( $21,5 \pm 6,1$  mg/dL) encontrava-se ligeiramente mais elevada do que a das mulheres diabéticas ( $18,7 \pm 4,2$  mg/dL). Existem outros autores que também verificaram que os níveis de glicose salivar têm tendência para ser ligeiramente mais elevados nos homens diabéticos do que nas mulheres diabéticas (9, 63). A explicação poderá estar associada ao facto das mulheres (diabéticas) serem mais preocupadas e responsáveis para a manutenção dos valores da glicemia controladas (69). Na verdade há um estudo que refere que as mulheres são mais preocupadas com aspetos da própria saúde, enquanto os homens só procuram ajuda médica quando a situação já é crítica (69). Se se fizer uma comparação entre os homens do grupo controlo e os homens diabéticos, assim como entre as mulheres do grupo controlo e as mulheres diabéticas, a diferença da concentração de glicose salivar é significativa. Isto apenas reforça a ideia inicial deste estudo, que existe uma diferença significativa entre a glicose salivar entre o grupo controlo e os diabéticos é importante.

#### **A glicose salivar nos diabéticos e o tempo de duração da diabetes e da idade dos pacientes**

O tempo de duração da diabetes e o valor da glicose salivar foram também avaliados. Os nossos resultados indicam que não há relação entre o valor da glicose salivar e o tempo de duração da diabetes (Ilustração 14). Na nossa população contudo o tempo de duração da diabetes de cada indivíduo é bastante diferente com os diagnósticos de poucos meses e outros com 20/30 anos de evolução. A ausência de relação entre o tempo de duração da diabetes e o valor da glicose salivar foi também observada noutro estudo realizado por Gupta et al. (2015) (8). No entanto, quando se analisam os dados sem remover os 3 *outliers* verifica-se que, apesar de não ser estatisticamente significativa, há uma tendência para o aumento do valor de glicose salivar no grupo com diabetes há mais de 6 anos ( $33,1 \pm 7,3$  mg/dL versus  $21,1 \pm 2,2$  mg/dL). Há ainda que realçar que a presença dessas 3 concentrações da glicose salivar superiores às outras situam-se no grupo dos diabéticos há mais de 6 anos. Dada a relevância destes dados mais uma vez realça a necessidade de aumentar o número da amostra para obtermos valores mais representativos da nossa população.

Foi avaliada a relação dos valores da glicose salivar com a idade dos indivíduos que participaram no estudo (Ilustração 15). Verificou-se que a média dos níveis de glicose salivar nos indivíduos com menos de 70 anos e com mais de 70 anos de idade é semelhante, o que demonstra que a idade dos pacientes não afeta os valores da glicemia. Apesar da maioria dos estudos corroborarem os nossos (8, 63, 70), Rosa et al. (2009) demonstra a variação dos valores de glicose com a idade em ambos os sexos (68). A ausência de correlação no nosso estudo poderá estar relacionada com o fato da população do nosso estudo, ser, já por si, uma população envelhecida (59 a 72 anos). O aspeto da idade pode eventualmente interferir no controlo da diabetes em termos de própria consciência e responsabilidade em seguir os tratamentos de maneira a proporcionar um bom controlo dos valores da diabetes. Sabe-se também que com o envelhecimento há diminuição da capacidade de reagir ao stresse e há uma menor eficiência do sistema imunitário (71). Nesse sentido, e sabendo que a diabetes está associada a um aumento do estado inflamatório dos indivíduos, coloca-se a hipótese de quanto mais avançada for a idade do diabético maior o período de tempo em que os tecidos periodontais são sujeitos aos efeitos cumulativos de placa, a focos de acumulação bacteriana, a perda do nível clínico de inserção e a perda óssea (47, 48). Este processo inflamatório pode passar para a via sistémica interferindo com os mecanismos associados à insulina provocando a resistência à mesma e hiperglicemia (18, 42). Deste modo, consideramos que para aferir conclusões mais relevantes seria interessante o grupo de estudo ser mais heterogéneo a fim de se obter resultados mais conclusivos. Neste estudo, as colheitas de saliva foram realizadas a um grupo de séniores que participaram em atividades desportivas organizadas para os séniores. Este evento facilitou a colheita de saliva e o preenchimento dos questionários, tornando o processo mais simples, rápido e garantindo que os participantes se encontrassem todos nas mesmas condições. Todavia esta homogeneidade restringiu bastante a qualidade da amostra.

#### **A glicose salivar na periodontite**

No que diz respeito à saúde oral, mais precisamente à saúde periodontal dos diabéticos, foi possível afirmar que todos eles apresentam uma periodontite crónica avançada. Praticamente, metade dos controlos também apresentam periodontite crónica avançada, e outra metade periodontite crónica moderada (Ilustração 16). Há que realçar que a população em estudo está na faixa etária acima dos 59 anos e portanto com maior

predisposição para a existência de periodontites evolutivas (48). Sabe-se que a placa bacteriana, o tabaco, a medicação, as doenças sistémicas e as características genéticas, e as alterações do sistema imunitário são fatores de risco para a periodontite (47) e que estão mais intensificados nesta faixa etária, levando a uma maior progressão da doença periodontal pelos efeitos cumulativos durante vários anos. O sistema imunitário está claramente afetado na situação patológica da diabetes. Por outro lado, sabe-se que a hiperglicemia e o seu controlo são um determinante importante para desenvolvimento de periodontite (28, 29, 59). A presença de um ambiente hiperglicémico favorece o aumento de fatores de stresse responsáveis pela manifestação de doença periodontal (29, 59), e a colonização por agentes patogénicos do periodonto na cavidade oral, tal como Aa, Pg, Tf e Td (29, 59). Dos principais fatores descritos que estão alterados na diabetes e que podem ser os grandes mediadores das alterações observadas são a diminuição da capacidade fagocitária, diminuição da quimiotaxia dos neutrófilos, aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (59, 72). Há também a produção de osteoprotegerina, que é recetor ativador de NF $\kappa$ B e o ligando RANK, citocinas pro-inflamatórias, que além de contribuírem para o aumento da inflamação periodontal ainda contribuem para a diminuição do nível de inserção e a perda óssea (59, 72). Por outro lado, níveis de hiperglicemia estão associados ao aumento dos AGEs, característicos dos indivíduos com diabetes, que podem ligar-se às células do sistema imunitário, nomeadamente aos macrófagos e diminuir a sua atividade fagocitária, permitindo assim uma maior proliferação bacteriana. Consequentemente, a resposta inflamatória está aumentada, com o aumento da produção de mais citocinas pró-inflamatórias e portanto maior destruição do tecido conjuntivo e maior progressão da doença oral (21, 59, 60, 72).

De facto, a maior quantidade de glicose na saliva e no fluido crevicular estimula o crescimento bacteriano, reduz a capacidade de cicatrização promovida pelos fibroblastos e favorece a produção de ácido láctico, reduzindo assim o pH e consequentemente a atividade tampão da saliva (20). Isto pode explicar o motivo pelo qual há maior prevalência e severidade da doença periodontal em diabéticos (29). Logo, para além de serem diabéticos e como tal com hiperglicemia, a própria idade destes indivíduos também poderá contribuir para este estado patológico a nível periodontal, e portanto, mais uma vez, seria importante criar um grupo com idades mais heterogéneas

para verificar se a hiperglicemia apenas pode levar a um resultado tão evidente, como foi comprovado no estudo de Lasisi et al. (2012) (58).

#### **Grau de satisfação dos pacientes diabéticos e a técnica de medição de saliva não invasiva**

Quando se avaliou o método de medição da glicose de preferência escolhendo entre a saliva e o teste serológico, 72% dos pacientes diabéticos demonstraram um grande interesse e preferência pelo método da saliva (Ilustração 17). Os outros 28% mencionaram que não tinham preferência. Esses 28% dos diabéticos correspondem a indivíduos que têm o diagnóstico de diabetes há mais de 17 anos, e certamente já habituados à picada do teste serológico. Este resultado vai de encontro com outros estudos já publicados (2, 4, 10, 16).

#### **Ideias futuras baseadas nos resultados obtidos**

Outro parâmetro interessante para investigar neste género de estudo seria o efeito dos antidiabéticos orais na glicose salivar e definir a sua correlação com a periodontite. Este aspeto não foi avaliado pois a maioria dos diabéticos que participaram no estudo estão medicados com cloridrato de metformina (Anexo 4), não permitindo obter um resultado conclusivo.

Outra orientação para um próximo estudo seria recolher os valores da glicemia sanguínea ao mesmo tempo que é feita a recolha da saliva, e desta maneira permitir estabelecer uma correlação exata entre os níveis de glicose salivar e os níveis de glicose sanguínea. Para além de que a colheita de saliva e do sangue devem ser realizadas de preferência em jejum para não haver fatores adicionais a influenciar os resultados. E finalmente seria aconselhável estabelecer critérios de exclusão para as amostras de maneira a evitar qualquer distorção dos dados.

Em conclusão, com esta tese foi possível, para além da otimização da metodologia proposta, analisar todos os parâmetros estabelecidos nos objetivos do estudo que vão de encontro com resultados publicados noutros estudos.

## **CONCLUSÃO**



## 6. CONCLUSÃO

Estudos sobre a avaliação dos níveis de glicose salivar, como uma metodologia alternativa à metodologia serológica, são de extrema importância para o estabelecimento de formas não invasivas para o rastreio precoce da diabetes.

Neste presente estudo foi possível otimizar um método de determinação dos níveis da glicose na saliva recorrendo a um nanofotómetro e estabelecer um protocolo SOP para o efeito (Anexo 3), para aplicação futura na Instituição de Ciências da Saúde (ICS) na Universidade Católica Portuguesa (UCP) de Viseu.

Ao analisar os níveis de glicose medidos com a metodologia salivar e a metodologia serológica verificou-se a existência de uma possível relação direta entre os dois valores de glicose.

Usando a metodologia desenvolvida concluiu-se que os níveis de glicose salivar dos diabéticos são, em média, superiores aos níveis de glicose salivar dos não-diabéticos. No entanto, não se demonstrou alguma relação entre os níveis de glicose salivar e o sexo, a idade ou a duração da diabetes no grupo de diabéticos.

Apesar de já existirem alguns estudos que demonstrem uma relação direta entre os níveis de glicose na saliva e o seu efeito na periodontite, até ao momento ainda não existe nenhuma relação estabelecida na população portuguesa. Com este estudo piloto foi possível associar níveis de glicose salivar com a doença periodontal, demonstrando-se que há um aumento da patologia oral e do seu estado inflamatório numa situação de hiperglicemia.

No entanto, consideramos que a amostra em estudo deveria ser mais heterogénea e maior a fim de estabelecer correlações mais precisas. Assim, este estudo deixa em aberto várias questões que poderão ser respondidas em trabalhos futuros:

- 1) Qual a relação entre o valor da glicose salivar e da glicemia sanguínea?
- 2) Será que a ausência de diferença nos valores da glicose salivar relativamente à idade e ao tempo de duração da diabetes será eliminada se for usado uma população controlo mais heterogénea e com um maior número de indivíduos?
- 3) Serão os valores da glicose salivar mais correlacionados com os valores da HbA1c?

- 4) Que outras moléculas presentes na saliva estarão alteradas numa situação de diabetes?

## **BIBLIOGRAFIA**



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Lasisi TJ, Fasanmade AA. Salivary flow and composition in diabetic and non-diabetic subjects. *Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria*. 2012;27(1):79-82.
2. Mascarenhas P, Fatela B, Barahona I. Effect of diabetes mellitus type 2 on salivary glucose--a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PloS one*. 2014;9(7):e101706.
3. Nagalaxmi V, Priyanka V. Can saliva be a marker for predicting type 1 diabetes mellitus?-A pilot study. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*. 2011;23(4):579.
4. Desai GS, Mathews ST. Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance. *World J Diabetes*. 2014;5(6):730-8.
5. Balan P, Babu SG, Sucheta KN, Shetty SR, Rangare AL, Castelino RL, et al. Can saliva offer an advantage in monitoring of diabetes mellitus? - A case control study. *Journal of clinical and experimental dentistry*. 2014;6(4):e335-8.
6. Abikshyeet P, Ramesh V, Oza N. Glucose estimation in the salivary secretion of diabetes mellitus patients. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2012;5:149-54.
7. Zhang W, Du Y, Wang ML. Noninvasive glucose monitoring using saliva nano-biosensor. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 2015;4:23-9.
8. Gupta S, Sandhu SV, Bansal H, Sharma D. Comparison of salivary and serum glucose levels in diabetic patients. *Journal of diabetes science and technology*. 2015;9(1):91-6.
9. Panchbhai AS. Correlation of salivary glucose level with blood glucose level in diabetes mellitus. *Journal of oral & maxillofacial research*. 2012;3(3):e3.
10. Satish BN, Srikala P, Maharudrappa B, Awanti SM, Kumar P, Hugar D. Saliva: A tool in assessing glucose levels in Diabetes Mellitus. *Journal of international oral health : JIOH*. 2014;6(2):114-7.
11. Barnes VM, Kennedy AD, Panagakos F, Devizio W, Trivedi HM, Jonsson T, et al. Global metabolomic analysis of human saliva and plasma from healthy and diabetic subjects, with and without periodontal disease. *PloS one*. 2014;9(8):e105181.
12. Strauss SM, Tuthill J, Singh G, Rindskopf D, Maggiore JA, Schoor R, et al. A novel intraoral diabetes screening approach in periodontal patients: results of a pilot study. *Journal of periodontology*. 2012;83(6):699-706.
13. Rosedale MT, Strauss SM. Diabetes screening at the periodontal visit: patient and provider experiences with two screening approaches. *International journal of dental hygiene*. 2012;10(4):250-8.
14. Kumar S, Padmashree S, Jayalekshmi R. Correlation of salivary glucose, blood glucose and oral candidal carriage in the saliva of type 2 diabetics: A case-control study. *Contemporary clinical dentistry*. 2014;5(3):312-7.
15. Patel BJ, Dave B, Dave D, Karmakar P, Shah M, Sarvaiya B. Comparison and Correlation of Glucose Levels in Serum and Saliva of Both Diabetic and Non-diabetic Patients. *Journal of international oral health : JIOH*. 2015;7(8):70-6.
16. Azizi A, Modaberi A. The correlation of blood glucose with salivary glucose level in diabetic patients. *Journal of Islamic Dental Association of IRAN (JIDAI)*. 2014;25(4):4.
17. Hallikerimath S. Study of serum and salivary glucose levels in type 2 diabetic patients. 2012.

18. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21-31.
19. Ferreira LT, Saviolli IH, Valenti VE, Abreu Ld. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arq bras cienc saúde*. 2011;36(3):182-8.
20. Alves C, Andion J, Brandão M, Menezes R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. *Arq bras endocrinol metab*. 2007;51(7):1050-7.
21. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2013;36 Suppl 1:S67-74.
22. Prado BN, Vaccarezza GF. Alterações bucais em pacientes diabéticos. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo*. 2013;25(2):147-53.
23. Souza CFd, Gross JL, Gerchman F, Leitão CB. Prediabetes: diagnosis, evaluation of chronic complications, and treatment. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2012;56(5):275-84.
24. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. Norma da Direção-Geral de Saúde Departamento da Qualidade na Saúde - Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Diabetes. 2011:1-13.
25. Netto AP, Andriolo A, Fraige Filho F, Tambascia M, Gomes MdB, Melo M, et al. Update on glycated hemoglobin (HbA1C) for assessment of glycemic control and the diagnosis of diabetes: clinical and laboratory aspects. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2009;45(1):31-48.
26. Kerner W, Brückel J. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel*. 2013;8(S 02):S104-S7.
27. Global status report on noncommunicable diseases 2014. World Health Organization. 2012:1-280.
28. Al-Maskari AY, Al-Maskari MY, Al-Sudairy S. Oral manifestations and complications of diabetes mellitus: a review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2011;11(2):179.
29. Figueiredo LMG, Trindade SC. Periodontite versus diabetes mellitus: estado da arte. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2011;10(3):270-6.
30. Guyton AC, Hall JE, Zocchi L, Aicardi G. *Fisiologia médica*: Elsevier; 2006.
31. Araújo LMB, Britto MM, da Cruz P, Thomaz R. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2000;44(6):509-18.
32. Conjunto PO. Diabetes mellitus e exercício.
33. Silveira LAG. Correlação entre obesidade e diabetes tipo 2. *Rev Digital Vida e Saúde*. 2003;2(2).
34. Escobar FdA. Relação entre Obesidade e Diabete Mellitus Tipo II em Adultos. *Cadernos UniFOA*, edição nº 11. 2009.
35. Fanelli C, Porcellati F, Rossetti P, Bolli G. Glucagon: the effects of its excess and deficiency on insulin action. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*. 2006;16:S28-S34.
36. Pereira C, Lourenço F, Castro P, Rola J, Jacquet J. A Diabetes Mellitus e suas Complicações. *Relembrar para Prevenir. Medicina Interna*. 1999:54-66.
37. Cowart SL, Stachura ME. Glucosuria. *X Enocrine system*. 1990:653-7.
38. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clinical chemistry*. 2011;57(5):675-87.
39. Arora KS, Binjoo N, Reddy GR, Kaur P, Modgil R, Negi LS. Determination of normal range for fasting salivary glucose in Type 1 diabetics. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 2015;5(5):377.

40. Grillo MdFF, Gorini MIPC. Characterization of people with Diabetes Mellitus Type 2. *Revista brasileira de enfermagem*. 2007;60(1):49-54.
41. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Ferraris MEGd, Peydró A. Alteraciones salivares en pacientes con diabetes tipo 2. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 2006;11:309-14.
42. Gursoy UK, Yildiz Ciftlikli S, Kononen E, Gursoy M, Dogan B. Salivary interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha in relation to periodontitis and glycemic status in type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes*. 2015;7(5):681-8.
43. Cerchiari DP, Moricz RDd, Sanjar FA, Rapoport PB, Moretti G, Guerra MM. Burning mouth syndrome: etiology. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2006;72(3):419-24.
44. Standl E, Füchtenbusch M. The role of oral antidiabetic agents: why and when to use an early-phase insulin secretion agent in Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2003;46(1):M30-M6.
45. Steck AK, Klingensmith GJ, Fiallo-Scharer R. Recent advances in insulin treatment of children. *Pediatric diabetes*. 2007;8(s6):49-56.
46. Fowler MJ. Diabetes treatment, part 2: oral agents for glycemic management. *Clinical diabetes*. 2007;25(4):131-4.
47. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza periodontia clínica*: Elsevier Brasil; 2012.
48. Lang NP, Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 2 Volume Set*: John Wiley & Sons; 2015.
49. Wolf HF, Rateitschak E, Rateitschak K, Hassell T. *Color atlas of dental medicine: periodontology*. Thieme, New York. 2005:39-66.
50. Dias LZS, Piol SAC, de Almeida CSL. Atual classificação das doenças periodontais. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research*. 2006.
51. Márquez GADL. Prevalência da doença periodontal de uma população de utentes em cuidados de saúde primários inscritos na Unidade Saúde Familiar (USF) Espinho: [sn]; 2014.
52. Proença A, Pacheco JJ, Cabral CT. Antibióticos no tratamento coadjuvante das periodonitites. *Revista da Ordem dos Médicos Dentistas, Formação e ciência*. 2015(25):2-8.
53. Oral health. World Health Organization. 2012.
54. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's clinical periodontology*: Elsevier health sciences; 2011.
55. Botero J, Bedoya E. Determinantes del diagnóstico periodontal. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 2010;3(2):94-9.
56. Syndergaard B, Al-Sabbagh M, Kryscio RJ, Xi J, Ding X, Ebersole JL, et al. Salivary biomarkers associated with gingivitis and response to therapy. *Journal of periodontology*. 2014;85(8):e295-303.
57. Drumond-Santana T, Costa FO, Zenóbio EG, Soares RV, Santana TD. Impact of periodontal disease on quality of life for dentate diabetics. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007;23(3):637-44.
58. Lasisi TJ, Fasanmade AA. Comparative analysis of salivary glucose and electrolytes in diabetic individuals with periodontitis. *Annals of Ibadan postgraduate medicine*. 2012;10(1):25-30.
59. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 2006;77(8):1289-303.
60. Leorik Pereira Da Silva JDRT, Bruno Cesar De Vasconcelos Gurgel, Hébel Cavalcanti Galvão, Roseana De Almeida Freitas. Associação bidirecional entre diabetes mellitus e doença periodontal: uma revisão. *Revista UNINGÁ Review*. 2015;24(1):71-4.

61. Naik VV, Satpathy Y, Pilli GS, Mishra MN. Comparison and correlation of glucose levels in serum and saliva of patients with diabetes mellitus. *Indian Journal of Public Health Research & Development*. 2011;2(1).
62. Hegde A, Shenoy R, D'Mello P, Smitha A, Tintu A, Manjrekar P. Alternative markers of glycaemic status in diabetes mellitus. *Biomedical Research*. 2010;21(3):252-6.
63. Darwazeh A, MacFarlane T, McCuish A, Lamey PJ. Mixed salivary glucose levels and candidal carriage in patients with diabetes mellitus. *Journal of oral pathology & medicine*. 1991;20(6):280-3.
64. Soares MS, Batista-Filho MM, Pimentel MJ, Passos IA, Chimenos-Kustner E. Determination of salivary glucose in healthy adults. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 2009;14(10):e510-3.
65. Rosa N, Marques J, Esteves E, Fernandes M, Mendes VM, Afonso A, et al. Protein Quality Assessment on Saliva Samples for Biobanking Purposes. *Biopreservation and biobanking*. 2016.
66. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of clinical pathology*. 1969;22(2):158-61.
67. Marchetti P, Tognarelli M, Giannarelli R, Grossi C, Picaro L, di Carlo A, et al. Decreased salivary glucose secretory rate: usefulness for detection of diabetic patients with autonomic neuropathy. *Diabetes research and clinical practice*. 1989;7(3):181-6.
68. Rosa AMR, Morelli LdF, Almança CCJ. Níveis e taxas de glicose no sangue e a sua relação com o sexo e idade. XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2009:1-4.
69. Costa-Júnior FMd, Maia ACB. Conceptions of hospitalized men about the relation between gender and health. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*. 2009;25(1):55-63.
70. Sashikumar R, Kannan R. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2010;109(5):706-11.
71. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
72. Bascones-Martínez A, Muñoz-Corcuera M, Noronha S, Mota P, Bascones-Ilundain C, Campo-Trapero J. Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 2009;14(12):e680-5.

**ANEXOS**



## ANEXOS

### Anexo I – Carta enviada à Comissão de Ética.



Exmo Sr.

*Coordenador do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, Departamento de Ciências da Saúde, Viseu*

Joana Salgado, Professora Doutora convidada do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa e Orientadora da Monografia: “ Estudo piloto de avaliação da glicose salivar em séniores” e Vanessa Miranda, aluna do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, orientanda, vêm requerer o seu deferimento para a realização do seu projeto de investigação.

Pretende-se, com este trabalho: 1. Estabelecer uma nova metodologia para a determinação dos níveis de glicose salivar com a otimização de uma técnica que inclui recolha, armazenamento e processamento da amostra, com o intuito final de avaliar o valor da glicose salivar; 2. Avaliar os níveis de glicose salivar num grupo de utentes com DMT2 diagnosticada e comparar com um grupo de utentes considerados controlo e portanto, saudáveis; 3. Avaliar o papel da hiperglicose salivar no diagnóstico periodontal. Este estudo irá também permitir validar a avaliação da glicose salivar como um método não invasivo e comprovar que os indivíduos diabéticos apresentam um valor de glicose salivar superior, comparativamente aos indivíduos controlo. Por fim, pretende-se fazer uma avaliação comparativa sobre os valores de glicose obtida na saliva e o grau de inflamação oral. Esta pesquisa será feita através da aplicação de um inquérito aos pacientes (modelo que permite obter dados como idade, sexo, hábitos tabágicos e medicação habitual), adaptação da metodologia de oxidação da glicose para a avaliação da glicose na saliva e pela observação e exame clínico que achamos necessário e essencial para o registo de parâmetros da periodontite.

Cada paciente incluído no estudo será esclarecido sobre o mesmo e preencherá um documento de consentimento informado (Anexo 2).

Solicitamos então que Sua Excelência nos conceda autorização para a distribuição dos referidos documentos supracitados (consentimento informado e inquérito), para os testes laboratoriais e para toda a observação clínica necessária.

Agradecendo a atenção dispensada ao assunto, e abertos a qualquer tipo de esclarecimentos que ache útil, deixamos os nossos cumprimentos sinceros.

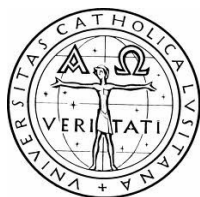
Pede deferimento,

Viseu, 15 de Fevereiro de 2016

---

(Orientadora: Joana Salgado)

## Anexo 2 – Declaração de Consentimento informado.



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

Centro Regional de Viseu

### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

*“Estudo Piloto de avaliação da glicose salivar em séniores”*

O objetivo deste estudo será recolher dados relevantes ao desenvolvimento de uma Tese de Monografia, no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa.

Este estudo não envolve procedimentos que não se enquadrem na prática clínica normal nem pretende testar novos produtos ou medicamentos.

Ao decidir participar pode efetuar todas as questões que achar necessárias para o seu esclarecimento ou facultar informações aos responsáveis do estudo em qualquer etapa do mesmo. Em qualquer momento poderá requerer informações sobre os resultados obtidos que lhe serão facultados se assim o desejar.

A participação neste estudo é totalmente voluntária, podendo retirar o seu consentimento informado da participação em qualquer etapa do estudo sem necessidade de facultar explicações aos seus responsáveis.

Todas as perguntas e eventuais dados fornecidos serão apenas utilizados pelos responsáveis do estudo.

A informação recolhida será tratada com a máxima confidencialidade, sendo o seu nome codificado e tendo apenas o investigador acesso a essa mesma informação.

A investigação tem como responsáveis o Prof.<sup>a</sup> Doutor<sup>a</sup> Joana Salgado, Prof. Doutor Tiago Marques e a estudante Vanessa Miranda.

Eu, \_\_\_\_\_ autorizo que os dados do meu processo sejam usados para este estudo e declaro que fui devidamente informado(a) e esclarecido(a).

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

Viseu, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016

\_\_\_\_\_  
Joana Salgado

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Vanessa Miranda

### Anexo 3 – SOP, D-Glicose GOD-POD, *Nanovue* Spectrophotometer method.



Universidade  
Católica  
Portuguesa

## Standard Operating Procedure

<b>D-Glicose GOD-POD, <i>NanoVue</i> Spectrophotometer method</b>		
<b>SalivaTec Lab</b>	<b>Pages: 8</b>	
<b>SOP-SL-006</b>	<b>Date: May 28<sup>th</sup> 2016</b>	<b>Version: 1.0</b>

	<b>Name</b>	<b>Title</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Author(s)</b>	Vanessa Miranda, Daniela Figueiredo			
<b>Reviewer</b>	<b>Nuno Rosa</b>			
<b>Authorizer</b>	<b>Nuno Rosa</b>			

<b>Effective date</b>	
<b>Review date</b>	

**Aim:** Determination of D-glicose in saliva samples using the *NanoVue* Spectrophotometer.

**Note:** Every equipment/material/reagent is found in the SalivaTec Laboratory, unless stated otherwise.

#### 1. Equipment:


- NanoVue Spectrophotometer
- Bench A
- Incubation Shaker (Minitron)
- Bench A
- Vortex
- Bench A

## 2. Material:

- 10µL and 100 µL Micropipettes and tips
  - Bench B and C
- Eppendorf
  - Bench A, Drawer Block 1A
- Permanent pen
  - Bench B, Shelf 4D
- Eppendorf's support
  - Bench B, Shelf 1D
- Saliva samples (see SOP-SL-002 "Saliva collection by cotton rolls or gauze")
  - -80°C, Lab 0.1
- Ice
  - Lab 0.1
- Cleaning paper
  - Bench A

## 3. Reagents:

- Mili\_Q water
  - Bench E, Shelf 1E
- Isopropanol
  - Bench D, Shelf 3D
- D-Glucose GOD-POD reagent
  - -80 °C Freezer, Lab 0.1

Substance identification	Dangers description
Isopropanol	Flammable Various Dangers 

#### 4. Personal safety:

- Lab coat
- Nitrile or latex gloves

#### 5. Procedure:

##### 5.1. Samples processing

5.1.1. Prepare the blank mixing the GOD-POD reagent and the Mili\_Q water and prepare the samples mixing the GOD-POD reagent and the saliva samples with the volumes indicated in the table 1.

Table 1 Applied doses for the blank and saliva samples.

	Blank (µL)	Sample (µL)
GOD-POD reagent	100	100
MiliQ water	10	
Saliva Sample		10

**Note:** To prepare the GOD-POD reagent see annex 1.

5.1.2. Prepare the glucose concentrations mixing the GOD-POD reagent, Mili\_Q water and D-Glucose standard solution 1.0 mg/mL (solution 3 of the D-Glucose GOD-POD kit, see Annex) to obtain the calibration curve applying the volumes mentioned in the table 2. Replicate each glucose concentration 3 times in order to get each ones absorbance mean.


Table 2 Applied doses for the calibration curve.

Glucose [µg/mL]	GOD-POD reagent (µL)	MiliQ water (µL)	D-Glucose standard solution 1.0 mg/mL (µL)
0	88	22	0
25	88	19,3	2,7
50	88	16,5	5,5
100	88	11	11
200	88	0	22

5.1.3. Incubate all the pre-prepared samples in the Incubation Shaker (Minitron) at low orbital agitation, at a temperature between 40°C and 50°C for 20 minutes.

5.1.4. Put the samples on ice to stop the chemical reaction.

## 5.2. Analysis with the *NanoVue* Spectrophotometer – Calibration curve

5.2.1 Turn on the *NanoVue* ably clicking the on button .

5.2.2 Select option 2 "Applications".


5.2.3 Select option 1 "Single Wavelength" and fix the following parameters:

**Wavelength:** 510 nm

**Mode:** Absorbance

**Pathlength:** 0,5 mm

5.2.4 Open the lid and clean the photocell with cleaning paper impregnated with isopropanol and then repeat the same with Mili\_Q water.

5.2.5 Pipette 5 µl of the blank on the photocell to the get the first zero. Select the button . Repeat the process for the second zero.

5.2.6 Clean the photocell with cleaning paper with impregnated Mili\_Q Water.

**Note:** Repeat this step before each sample placed in the *NanoVue* photocell.

5.2.7 Register each one of the three absorbances as the absorbances of the first concentration of glucose for the

calibration curve, as shown at table 3. Do the same for the other glucose concentrations and calculate the means.


**Table 3 – Absorbance registration for the calibration curve**

Glicose [µg/mL]	Absorbance 1	Absorbance 2	Absorbance 3	Mean
0				
25				
50				
100				
200				

5.2.8 Create your calibration curve using the glucose concentrations at the XX axis and the absorbance means at the YY axis.

5.2.9 Use the linear trendline of your calibration curve and its equation for posterior determination of the glucose concentrations in your saliva samples.

### 5.3. Analysis with the *NanoVue* Spectrophotometer – Determination of D-glucose in the saliva samples

5.3.1. Pipette 5 µl of the first saliva sample and place in the *NanoVue* photocell. Close the lid and select .

5.3.2. Register the absorbance of the saliva sample.

5.3.3. Clean the photocell after the quantification of the sample with cleaning paper and MiliQ water.

5.3.4. Repeat step 5.3.1, 5.3.2 and 5.3.3 for each sample.

5.3.5. At the end of the quantification of all the samples clean the *NanoVue* photocell with cleaning paper and isopropanol.

5.3.6. Use the linear trendline equation to determine the glucose concentration (x) of your saliva samples. Substitute the y of the equation by the absorbance value obtained for each saliva sample.

5.3.7. Convert the glucose concentration unit [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] obtained into [ $\text{mg}/\text{dL}$ ].

**Note:** Only use isopropanol to clean the photocell before the zeros and at the end of the usage of the *NanoVue*.

## Annex 1

### D-Glucose GOD-POD method, preparation of the reagent

#### 1. Material:

- 1000mL Plastic Recipient
  - Bench A, Container 1A
- 15 mL Falcon tubes
  - Bench A, Drawer Block 1A
- Pipetboy acu
  - Bench D, Shelf 4D
- Aluminum foil
  - Bench D, Drawer Block 2D

#### 2. Reagents:

- D-Glucose GOD-POD kit
  - Fridge

- Mili\_Q water
  - Bench E, Shelf 1E

### 3. Procedure:

3.1. Prepare the solutions following the procedure mentioned in the table 1.

**Table 1 – Solutions Preparation.**

<b>Solution 1 - GOD-POD reagent buffer</b>	Dilute the contents of bottle to 1 L with distilled water and use immediately. Cover this bottle with aluminum foil or use an opaque bottle to protect the enclosed reagent from light.
<b>Solution 2 - GOD-POD reagent enzymes</b>	Dissolve the contents of bottle 2 in approx. 20 mL of solution 1 and quantitatively transfer this to the bottle containing the remainder of solution 1. <b><i>This will be your GOD-POD reagent.</i></b> Cover this bottle with aluminum foil to protect the enclosed reagent from light.
<b>Solution 3 - D-Glucose standard solution</b>	No preparation needed.

**Note:** The solution 1 is stable for 3 years at 4 °C. The solution 2 is stable for 5 years at -20 °C. The GOD-POD reagent solution obtained is stable for 3 months at 2-5 °C or 12 months at -20 °C. The solution 3 is stable for 5 years at room temperature.



#### Anexo 4 – Grupo dos indivíduos diabéticos.

Identificação do diabético	Sexo	Idade	Diagnóstico Periodontal	Glicose salivar [mg/dL]	Glicose sanguínea [mg/dL]	Medicação para Diabetes	Tempo de Diabetes
1.	M	75	PCA	22,6	108	Metformina	7anos
2.	F	60	PCA	24,6	104	Metformina	5anos
3.	F	83	PCA	17,2	99	Gliclazida	6anos
4.	M	72	PCA	16,0	135	Metformina	1mes
5.	M	69	PCA	19,6	131	Metformina	10anos
6.	M	76	PCA	58,2	129	Metformina	8 anos
7.	M	59	PCA	13,6	160	Eucreas, Gliclazida	19 anos
8.	M	71	PCA	26,6	105	Metformina	6meses
9.	M	86	PCA	22,6	170	Insulina	40anos
10.	M	69	PCA	18,6	200	Metformina	7anos
11.	F	70	PCA	24,4	117	Metformina	5meses
12.	M	80	desd. tot.	14,0	101	Metformina	4anos
13.	F	68	PCA	15,0	n. mede	Metformina	2anos
14.	M	63	PCA	27,0	n. mede	Metformina	1ano
15.	F	79	PCA	21,4	100	Sem med.	8anos
16.	F	63	PCA	15,0	108	Gliclazida	2anos
17.	F	74	PCA	88,0	110	Sem med.	10 anos
18.	F	75	PCA	60,0	106	Metformina	25 anos
19.	M	68	PCA	33,6	130	Metformina	5anos
20.	M	76	PCA	21,8	180	Metformina	30anos
21.	F	67	PCA	14,6	110	Sem med.	4 anos
22.	F	81	PCA	17,8	137	Metformina	6 anos

PCA = Periodontite Crônica Avançada; desd. tot.= desdentado total; n. mede = não mede; sem med. = sem medicação; M = Mulher; H = Homem.

## Anexo 5 – Grupo dos indivíduos não-diabéticos.

Identificação dos não-diabéticos	Sexo	Idade	Diagnóstico Periodontal	Glicose salivar [mg/dL]	Outros
1.	M	65	PCM	10,0	HTA, patologia cardíaca.
2.	M	73	PCM	9,2	HTA.
3.	F	66	PCA	12,8	Saudável.
4.	F	71	PCA	15,2	HTA, hipercolesterolemia.
5.	F	80	desd. tot.	6,6	HTA, hipercolesterolemia, patologia cardíaca.
6.	F	80	PCA	12,6	Patologia cardíaca.
7.	F	79	PCM	12,8	HTA.
8.	M	64	PCM	5,6	HTA, hiperuricemia.
9.	M	70	PCA	9,8	HTA.
10.	F	72	PCM	13,4	HTA, hipercolesterolemia.
11.	F	81	PCA	12,0	HTA, hipercolesterolemia, patologia cardíaca.
12.	F	68	PCM	8,8	Bronquite.
13.	M	68	PCA	10,4	HTA.
14.	M	73	PCM	13,2	HTA, hipercolesterolemia, patologia cardíaca.
15.	F	73	PCM	9,8	HTA, hipercolesterolemia.
16.	M	70	PCA	18,4	HTA, hiperuricemia, hipotireoidismo, patologia cardíaca.
17.	F	72	desd. tot.	10,0	HTA, hipercolesterolemia, glaucoma.
18.	M	74	PCA	13,6	HTA, hipercolesterolemia.
19.	F	66	desd. tot.	11,4	HTA.
20.	M	68	PCM	10,8	HTA.
21.	F	60	PCA	14,4	HTA, hipotireoidismo.
22.	F	84	PCM	10,8	HTA, patologia cardíaca, hipotireoidismo.
23.	F	87	PCM	8,4	HTA, hipercolesterolemia, patologia cardíaca.

PCM = Periodontite Crónica Moderada; PCA = Periodontite Crónica Avançada; desd. tot.= desdentado total; HTA = Hipertensão arterial; M = Mulher; H = Homem.