

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

PRISCILA PAGANINI COSTA

**Biomarcadores Salivares de Pacientes Periodontais com Diabetes
Mellitus Tipo 2**

Ribeirão Preto

2008

PRISCILA PAGANINI COSTA

**Biomarcadores Salivares de Pacientes Periodontais com Diabetes
Mellitus Tipo 2**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Taba Júnior

Ribeirão Preto

2008

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Priscila Paganini

Biomarcadores salivares de pacientes periodontais com diabetes mellitus tipo 2/ Priscila Paganini Costa; orientador Mário Taba Júnior.

Ribeirão Preto, 2008.

99p.: i.; 30 cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Periodontia. Área de concentração: Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1.Periodontite. 2.Diabetes mellitus. 3. Saliva. 4. Biomarcadores.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Paganini Costa

Biomarcadores salivares de pacientes periodontais com diabetes mellitus tipo 2

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Periodontia

Aprovado em: ____ / ____ / 2008

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais

João e Ana Maria,

Exemplos de perseverança, coragem e disciplina,

Companheiros por toda vida,

Que sempre me guiaram e me apoiaram,

Com amor incondicional, dedicação e confiança.

A vocês, minha eterna gratidão e todo o meu amor.

Às minhas irmãs

Alessandra, Andréa e Cintia,

Pelo estímulo e carinho.

Agradeço ao ombro amigo.

Pela força que vocês me oferecem

me fazendo erguer os olhos em todos os momentos.

Ao meu orientador

Prof. Dr. Mario Taba Jr,

Cuja sabedoria me proporcionou um grande aprendizado,
me oferecendo tranqüilidade para realizar este estudo.

Sempre atencioso, com sua dedicação,
me ajudou a abrir um leque de conhecimentos.

A você, que de forma brilhante se dedica à pesquisa científica,
meus sinceros agradecimentos por despertar em mim a ânsia pelo saber.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo o dom da vida.

À minha família, especialmente aos meus cunhados pelo apoio e carinho, e aos meus sobrinhos, alegrias do meu viver.

Ao Rodrigo, meu amor, pelo companheirismo, sabedoria e equilíbrio, tornando meus dias mais alegres e serenos.

À amiga e Prof. Maria Letícia Bucchianeri Pinheiro, pelo incentivo, dedicação e confiança na minha formação profissional.

A todas as minhas amigas, principalmente à Tetê e à Fernanda, por partilharmos juntas momentos tão especiais e pela verdadeira amizade.

Aos professores do curso de Periodontia Arthur Belém Novaes Jr, Márcio Fernando de Moraes Grisi, Sérgio Luís Scombatti de Souza e Daniela Bazan Palioto, pelo profissionalismo, que conduziram o curso, e pelo apoio.

Aos amigos de mestrado e doutorado por compartilharem comigo os momentos e as emoções desta trajetória.

A todos os funcionários desta instituição, de forma especial à Tati, Dulce, Fabíola, Zilda, Sueli e Sandra pelo auxílio e atenção desprendidos.

À Prof. Maria Cristina Foss e às funcionárias Ivanilda e Marivone, pela colaboração e atenção durante o período em que estive no Hospital das Clínicas e no Centro de Saúde Escola.

Aos meus pacientes, pela cooperação e esforço, sem os quais este trabalho não seria possível.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

O diagnóstico periodontal tradicional inclui parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, nível clínico de inserção, índice de placa e perda óssea alveolar verificada por método radiográfico. Estas medidas fornecem informações primárias sobre a severidade da periodontite, mas não mensuram a atividade da doença^{1,2}. O diagnóstico da fase ativa da periodontite e a identificação de pacientes com risco para a doença representam uma mudança para as investigações clínicas³. Avanços nas pesquisas em Periodontia estão direcionando os métodos de diagnóstico para que a atividade da doença possa ser identificada por mensurações de biomarcadores encontrados em amostras de fluido crevicular gengival, soro e saliva^{4,5}.

A saliva é um fluido fisiológico, elaborado a partir das secreções de glândulas salivares e que contém proteínas produzidas localmente, bem como outras moléculas da circulação sistêmica⁶. Isso a torna uma potencial candidata para identificar biomarcadores que reflitam as alterações da periodontite e de outras doenças bucais e sistêmicas. Além disso, a saliva apresenta vantagens como fácil manipulação, característica não-invasiva, coleta simples e, geralmente, maiores quantidades^{7,8}. Os testes salivares já têm sido utilizados no diagnóstico e na identificação do risco ao desenvolvimento de determinadas doenças sistêmicas como Aids e hepatite, bem como na avaliação da atividade de cárie⁵.

A periodontite é uma doença inflamatória que afeta o tecido conjuntivo de inserção e osso de suporte ao redor do dente⁹. O desencadeamento da doença deve-se ao desequilíbrio entre as bactérias e a resposta do hospedeiro, que gera

uma descarga de componentes pró-inflamatórios e de outras moléculas, promovendo destruição do tecido conjuntivo e ósseo¹⁰. Dessa forma, parece ser plausível a hipótese de que a saliva contém biomarcadores para periodontite como tem sido observado no fluido crevicular gengival¹¹.

Os biomarcadores podem ter diversas aplicações na biologia moderna e na medicina: desde o monitoramento de doenças como câncer (antígeno carcembrionário), diabetes mellitus (Hemoglobina A1c) e doenças auto-imunes (Fator reumatóide), como o diagnóstico destas¹². A análise da saliva pode ser especialmente benéfica na determinação do status periodontal atual, por meio da busca de biomarcadores que possam melhor caracterizar a periodontite⁵. Estudos têm indicado que a determinação dos níveis de mediadores inflamatórios em fluidos biológicos são bons indicadores da atividade inflamatória; além de examinarem se marcadores bioquímicos e imunológicos na saliva e/ou no fluido crevicular gengival podem refletir a extensão da destruição periodontal e também se são capazes de indicar a direção futura da progressão da doença^{13,5}.

Algumas pesquisas demonstraram resultados satisfatórios na utilização da saliva para monitoramento de biomarcadores em pacientes periodontais^{6,10}. O estudo realizado por Miller et al.⁶ analisou as concentrações de interleucina-1 β (IL-1 β), metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8) e osteoprotegerina (OPG) em 28 pacientes com periodontite crônica e 29 indivíduos saudáveis, que foram utilizados como controle, e verificaram que as concentrações de IL-1 β e MMP-8 foram significativamente mais altas nos pacientes periodontais quando comparados ao grupo controle.

Ng et al.¹⁰ avaliaram a associação entre a evidência radiográfica de perda óssea e a concentração de fatores de reabsorção óssea do hospedeiro como

interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e prostaglandina E₂ (PGE₂) e marcadores de remodelação óssea (piridinolina interligada ao telopeptídeo carboxiterminal de colágeno tipo I – ICTP, osteocalcina e osteonectina) em saliva de 110 pacientes periodontais. Dentro dos resultados obtidos, pode-se verificar que as concentrações de IL-1 β , IL-6, PGE₂, osteocalcina e osteonectina estão relacionadas significativamente com perda óssea. A partir disso, os autores concluíram que a quantificação desses biomarcadores na saliva pode servir como um importante método para monitorar e prever a susceptibilidade à periodontite.

Estes estudos^{6,10}, no entanto, não consideraram as possíveis associações da periodontite com outras doenças sistêmicas, como o diabetes mellitus. A literatura mostra que há uma relação bidirecional entre essas doenças, ou seja, o diabetes pode ser considerado como um fator de risco para a periodontite e esta, uma complicação do diabetes¹⁴.

Dentro desse contexto, o presente estudo propõe-se a analisar as concentrações salivares de IL-6, MMP-8 e OPG em pacientes com periodontite crônica associada ou não ao diabetes mellitus tipo 2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Griffiths GS, Wilton JM, Curtis MA, et al. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Clinical assessment of the periodontium. *J Clin Periodontol* 1988;15:403-410.
2. Greenstein G, Caton J. Periodontal disease activity: A critical assessment. *J Periodontol* 1990;61:543-552.
3. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. A review. *J Clin Periodontol* 2000;27:453-465.
4. Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol* 1997;107:347-352.
5. Taba Jr. M, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005;49(3):551-571.
6. Miller CS, King Jr. CP, Langub C, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease. A cross-sectional study. *JADA* 2006;137(5):7-16.
7. Lawrence, HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc* 2002;68(3):170-174.
8. Ito T, Komiya-Ito A, Arataki T, et al. Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis. *J Periodontol* 2008;79:316-322.
9. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. *J Periodontol* 1992;63:322-331.
10. Ng PYB, Donley M, Hausmann E, Hutson AD, Rossomando E, Scannapieco FA. Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and *in vitro* studies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;49:252-260.

11. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol 2000* 2005;39:53-72.
12. LaBaer J. So, you want to look for biomarkers (Introduction to the Special Biomarkers Issue). *J Proteome Res* 2005;4:1053-1059.
13. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 2004;343:1-16.
14. Papapanou PN. World Workshop in Clinical Periodontics. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996;1:1-36.

RESUMO

COSTA, P. P. **Biomarcadores salivares de pacientes periodontais com diabetes mellitus tipo 2**. 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A associação entre o diabetes e a periodontite produz uma descarga de proteínas inflamatórias que pode ser refletida na saliva. Com base nisso, o objetivo desse estudo foi mensurar as concentrações salivares de interleucina-6 (IL-6), metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8) e osteoprotegerina (OPG) em pacientes com periodontite crônica associada ou não ao diabetes mellitus tipo 2. Um total de 90 indivíduos foi dividido em quatro grupos: saudáveis (Controle, n=22), pacientes com doença periodontal (DP, n=24), apenas com diabetes mellitus (DM, n=20) e com doença periodontal e diabetes mellitus (DP+DM, n=24). Dados clínicos e metabólicos foram registrados. Amostras de saliva não-estimulada foram analisadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Diferenças estatisticamente significantes foram detectadas entre os grupos para todos marcadores ($p < 0,05$). Em relação à IL-6, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas comparando os grupos Controle com DP e com DP+DM, e entre os grupos DP+DM com DM ($p < 0,005$). Para MMP-8, a média das concentrações do grupo Controle foi significativamente menor que em todos os grupos doentes ($p < 0,01$) e nenhuma diferença entre os grupos doentes foi detectada. Para OPG, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre os grupos Controle com DP e entre Controle com DM ($p < 0,05$). Todos os parâmetros clínicos foram estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,001$), exceto supuração. No grupo DP, SS (sangramento à sondagem) mostrou uma correlação positiva com as concentrações de IL-6 ($r = 0,48$; $p < 0,05$), PS \geq 7 (profundidade de sondagem \geq 7mm) correlacionou-se positivamente com as concentrações de MMP-8 ($r = 0,46$; $p < 0,05$), e os níveis de HbA1c também correlacionaram-se positivamente com as concentrações de IL-6 ($r = 0,54$; $p < 0,000$). Concluindo, a saliva é um adequado substrato para identificação de biomarcadores inflamatórios em pacientes periodontais com ou sem diabetes. A IL-6 é um biomarcador candidato para periodontite e periodontite associada ao diabetes na saliva. Além disso, conclui-se que a super-expressão de MMP-8 e OPG pode acionar o aumento do colapso periodontal observado em indivíduos com diabetes tipo 2.

Palavras-chave: Periodontite; Diabetes mellitus; Saliva; Biomarcadores

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IL-1 β : interleucina-1 β

MMP-8: metaloproteinase da matriz-8

OPG: osteoprotegerina

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

IL-6: interleucina-6

PGE₂: prostaglandina E₂

ICTP: piridinolina interligada ao telopeptídeo carboxiterminal de colágeno tipo I

DP: pacientes com doença periodontal

DM: pacientes com diabetes mellitus

DP+DM: pacientes com doença periodontal e diabetes mellitus

ELISA: ensaio imunoenzimático

HbA1c: hemoglobina glicada A1c

AGEs: produtos finais da glicação avançada

RAGEs: receptores para produtos finais da glicação avançada

MMP: metaloproteinase da matriz

RANK: receptor ativador do fator kappa B nuclear

RANKL: ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear

PS: profundidade de sondagem

PS \leq 3: profundidade de sondagem \leq 3mm

PS4-6: profundidade de sondagem entre 4 e 6mm

PS \geq 7: profundidade de sondagem \geq 7mm

NIC: nível clínico de inserção relativo

SS: sangramento à sondagem

SUP: supuração

n. dentes: número de dentes

mm: milímetro

°C: graus Celsius

BSA: albumina sérica bovina

HPLC: cromatografia líquida de alta pressão

pg/ml: picograma por mililitro

ng/ml: nanograma por mililitro

r: valor da correlação

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA

RESUMO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 População do Estudo.....	27
2.2 Parâmetros clínicos.....	28
2.3 Coleta das Amostras de Saliva	28
2.4 Análise das Proteínas Salivares	29
2.5 Mensuração da Hemoglobina Glicada (HbA1c)	30
2.6 Análise Estatística.....	31
3 RESULTADOS	33
3.1 Características Demográficas e Clínicas	33
3.2 Concentração das Proteínas Salivares	34
3.3 Parâmetro Metabólico	35
3.4 Correlação entre Parâmetros Clínicos e Proteínas Salivares	35
3.5 Correlação entre Parâmetro Metabólico e Parâmetros Clínicos e Proteínas Salivares	36
4 DISCUSSÃO	48

5 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ARTIGO EM INGLÊS	64
ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória que resulta de um desequilíbrio na interação entre a microflora periodontal e a resposta multifacetada do sistema imune do hospedeiro¹. Este desequilíbrio desencadeia uma super-expressão de citocinas pró-inflamatórias e a subsequente destruição do tecido conjuntivo de inserção e do osso alveolar².

Evidências demonstram que o diabetes é um fator de risco para a periodontite³. Diabetes mellitus é uma desordem metabólica, caracterizada pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou ação da insulina⁴. Tem-se demonstrado que a hiperglicemia pode promover a glicação não-enzimática de proteínas do corpo, formando produtos finais da glicação avançada (AGEs). Os AGEs, no periodonto, estimulam o recrutamento de monócitos para o sítio e interagem com seus receptores (RAGEs) na superfície destas células. A interação AGE–RAGE induz uma mudança no fenótipo do monócito, sobre-regulando a célula e aumentando, significativamente, a produção de citocinas pró-inflamatórias⁵. Além disso, o diabetes pode modular a destruição do tecido periodontal pela redução da função de leucócitos polimorfonucleares, incluindo quimiotaxia, aderência e fagocitose⁶.

Diabetes e periodontite são doenças crônicas comuns em adultos. Ambas as doenças são altamente prevalentes na população mundial, e estima-se que 1 – 6% da população sofre de diabetes⁷. Por outro, a doença periodontal afeta mais de 50% da população adulta nos Estados Unidos⁸.

O diagnóstico periodontal tradicional inclui parâmetros clínicos e radiografias avaliando o nível do osso alveolar⁹. Entretanto, avanços em pesquisa de diagnóstico

oral e da doença periodontal estão direcionando os métodos para que o risco e atividade periodontal possam ser identificados e quantificados por mensurações objetivas tais como biomarcadores, que são encontrados em amostras de fluido crevicular gengival, soro e saliva e que podem potencialmente ser usados como marcador de diagnóstico¹⁰.

Interleucina-6 (IL-6) ordena a transição de inflamação aguda para crônica pela modificação do infiltrado leucocitário inato (de neutrófilos polimorfonucleares para monócitos/ macrófagos) e exerce efeito estimulador nas células T e B, favorecendo a resposta crônica inflamatória¹¹. Além disso, estimula a diferenciação celular de células progenitoras mesenquimais para a linhagem osteoblástica, é um potente agente anti-apoptótico nas células osteoblásticas, podendo favorecer a reabsorção óssea e induz a produção de metaloproteinases¹². Dessa forma, IL-6 parece ser um indicador útil ou um marcador de diagnóstico para periodontite¹³.

Metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8) é a principal metaloproteinase (MMP) destrutiva, envolvida na patogênese da periodontite, sendo encontrada em grandes quantidades em biópsias gengivais e em fluidos orais¹⁴. O neutrófilo polimorfonuclear é uma das células que produzem MMP-8, embora os fibroblastos também possam expressá-la¹⁵. Então, a literatura sugere que a MMP-8 tem um importante papel no monitoramento da periodontite¹⁶.

A osteoprotegerina (OPG) é um membro da família de receptor do fator de necrose tumoral (TNF), que é expresso por osteoblastos. A função da OPG é reduzir a interação entre o ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear (RANKL) e o receptor ativador do fator kappa B nuclear (RANK) da superfície celular, devido ao RANKL potencialmente estimular osteoclastos a aumentarem a reabsorção óssea. Então, quando a OPG liga-se ao RANKL, sua ação é bloqueada, reduzindo a

quantidade de reabsorção óssea¹⁷. Uma hipótese razoável é que a destruição óssea na periodontite está associada com a perturbação do equilíbrio entre RANKL e OPG. Por exemplo, elevados níveis de RANKL e/ou baixos níveis de OPG nos fluidos e tecidos resultam em um excesso de quantidade de RANKL livre capaz de estimular RANK, dessa forma, aumentando a reabsorção óssea por osteoclastos. Algumas citocinas, tais como Interleucina-1 (IL-1) e IL-6, são conhecidas por modular as concentrações de RANKL e OPG¹⁸.

A saliva tem o potencial para ser usada como um fluido diagnóstico para doença oral bem como o fluido crevicular gengival e o soro^{19,20}. Além disso, pode ser facilmente coletado, contém marcadores derivados localmente e sistemicamente, que conseqüentemente, podem oferecer base para um teste de diagnóstico específico para a periodontite²¹. De acordo com Pellegrini et al.²² e Ito et al.²³, a mensuração de biomarcadores na saliva pode servir como hábil instrumento para monitorar e prever a susceptibilidade à periodontite, fornecer informação para a severidade da doença e monitorar a efetividade da terapia periodontal.

Considerando o acúmulo de evidências e a necessidade de investigar ainda mais os biomarcadores inflamatórios na periodontite associada ao diabetes, o objetivo deste estudo foi mensurar as concentrações salivares de IL-6, MMP-8 e OPG em pacientes com periodontite associada ou não ao diabetes mellitus tipo 2.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 População do Estudo

Esse estudo foi conduzido em conjunto com o Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia e o Departamento de Medicina Interna – Divisão de Doenças Metabólicas e Endocrinológicas da Universidade de São Paulo. E foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, nº 2007.1.104.58.0 (Anexo A). Todos os indivíduos foram, individualmente, informados sobre a natureza do estudo proposto e assinaram o termo de consentimento (Anexo B).

Os indivíduos foram submetidos à anamnese, exame clínico e radiográfico. Os pacientes diabéticos tiveram os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) verificados pelo Setor Ambulatorial da Clínica de Endocrinologia – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. De acordo com a condição periodontal e o padrão geral de saúde, os indivíduos foram incluídos no estudo.

Os critérios de inclusão foram: (i) presença de pelo menos 15 dentes; (ii) no mínimo, um sítio com profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ e dois dentes com perda de inserção $\geq 6\text{mm}^2$; (iii) idade acima de 35 anos. Os critérios de exclusão incluíam: (i) uso de antibióticos ou tratamento periodontal nos últimos 6 meses; (ii) história positiva de tabagismo no prazo de cinco anos; (iii) grávidas ou lactentes; (iv) terapia medicamentosa, exceto para condição diabética; (v) presença de condições inflamatórias; (vi) complicações graves do diabetes.

Um total de 90 indivíduos foi dividido em quatro grupos: 22 indivíduos saudáveis (Controle), 24 pacientes com doença periodontal (DP), 20 pacientes

apenas com diabetes mellitus (DM), 24 pacientes com doença periodontal e diabetes mellitus (DP+DM).

2.2 Parâmetros Clínicos

O exame clínico foi realizado por único examinador experiente e registrado em seis sítios por dente, com auxílio de uma sonda periodontal computadorizada^δ (Figura 1). Os parâmetros verificados foram: profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção relativo (NIC), sangramento à sondagem (SS), supuração (SUP) e número de dentes (n. dentes).



Figura 1. Sonda periodontal computadorizada

2.3 Coleta das Amostras de Saliva

Saliva total não-estimulada foi coletada (~3ml) de cada indivíduo em tubos estéreis, de acordo com o método descrito por Navazesh²⁵. Os indivíduos estavam impedidos de comer, beber e higienizar a boca durante 2 horas antes da coleta de saliva. As amostras de saliva foram colocadas imediatamente no gelo e aliquotadas antes do congelamento a -80°C (Figura 2).

^δ Florida Probe®, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL

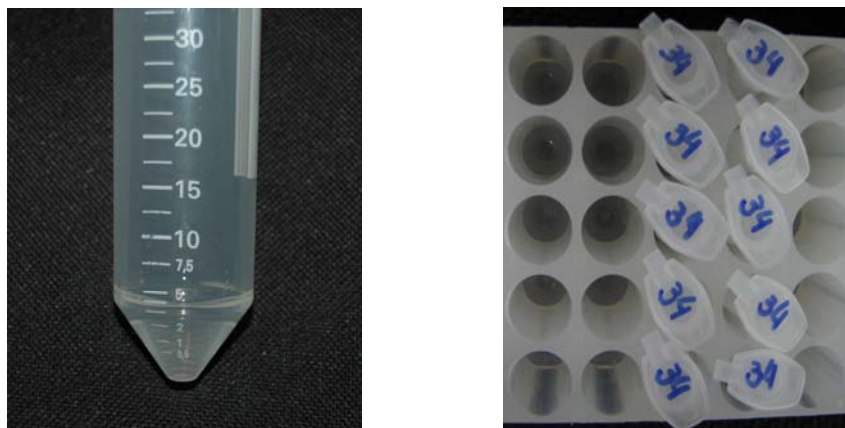


Figura 2. Saliva não-estimulada em tubo estéril e aliquoteada

2.4 Análise das Proteínas Salivares

As concentrações salivares de IL-6, MMP-8, OPG e Proteína Total foram determinadas em duplicatas para cada indivíduo, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA). Cada kit^γ para o ensaio da IL-6, MMP-8, OPG e Proteína Total foi realizado com um anticorpo monoclonal específico para cada molécula em questão e quantificado em placas para teste ELISA de 96 poços (Figura 3), de acordo com as instruções do fabricante.

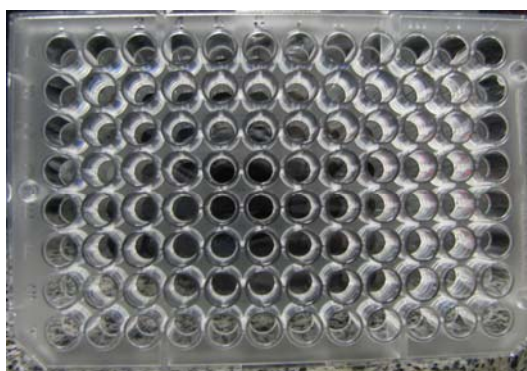


Figura 3. Placa de 96 poços para ELISA

Brevemente, todos os reagentes foram levados para uma temperatura ambiente, e o diluente foi adicionado em cada poço. Os modelos padrões ou

^γ Human Quantikine IL-6 ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA

^γ Human MMP-8/OPG DuoSet kit, R&D Systems, Minneapolis, USA

^γ Bio-Rad Bradford Total Protein Assay Kit, Bio-Rad, California, USA

amostras desconhecidas foram então adicionados aos poços em duplicata. Após um período de incubação, os poços foram lavados quatro vezes com solução tampão seguidas da adição de um segundo anticorpo específico de citocina-conjugada. A placa foi novamente incubada em temperatura ambiente e lavada em seguida. Um substrato foi adicionado em todos os poços e incubado (Figura 4), seguido de uma solução de parada. O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados utilizando um leitor^β de placas para ELISA (Figura 5). Uma curva padrão foi feita usando os padrões fornecidos no kit, e as concentrações das proteínas foram calculadas com base na curva padrão. Para o ensaio da Proteína Total, albumina sérica bovina (BSA) foi usada como padrão.



Figura 4. Reação do ELISA



Figura 5. Leitor de placas para ELISA

2.5 Mensuração da Hemoglobina Glicada (HbA1c)

Os níveis de HbA1c foram utilizados para a avaliação metabólica nos pacientes diabéticos. Os dados para HbA1c foram mensurados por cromatografia de

^β μQuant, Biotek Instruments, Vermont, USA

troca iônica HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) e os valores obtidos foram expressos em porcentagem.

2.6 Análise Estatística

Os dados foram registrados como média \pm desvio padrão e a unidade experimental foi o indivíduo. A análise Kruskal-Wallis One Way e o teste Mann-Whitney foram aplicados tanto para comparar os parâmetros clínicos entre os grupos como as concentrações das proteínas salivares dos grupos. As correlações entre as concentrações das proteínas salivares, os parâmetros clínicos e os níveis de HbA1c foram calculadas pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman. Os dados foram testados para normalidade antes de aplicar os testes adequados, paramétricos ou não-paramétricos. Para todas as análises estatísticas, adotou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Características Demográficas e Clínicas

Os parâmetros clínicos, a idade, o sexo e as concentrações das proteínas salivares foram mensurados nas amostras de saliva de 90 indivíduos: 22 saudáveis, 24 pacientes com doença periodontal, 20 pacientes apenas com diabetes mellitus tipo 2, 24 pacientes com doença periodontal e diabetes mellitus tipo 2. Sessenta eram mulheres e trinta, homens.

A idade e os parâmetros clínicos dos participantes recrutados para este estudo estão resumidos na Tabela 1. As médias de idade dos grupos Controle, DP e DP+DM foram semelhantes, $43,7 \pm 1,6$; $45,4 \pm 1,2$ e $47,8 \pm 1,4$ respectivamente. Somente a média de idade do grupo DM ($53,3 \pm 2,0$) foi mais alta que nos outros grupos. A maioria dos indivíduos participantes tinha mais que 20 dentes, com média de 26,4 para o grupo Controle, 23,7 para o grupo DP, 23,4 para o grupo DM e 21,5 para o grupo DP+DM.

Em relação aos parâmetros clínicos, somente SUP não foi estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,078$). Dessa forma, os dados mostraram que os outros parâmetros clínicos avaliados, PS, $PS \leq 3$, PS4-6, $PS \geq 7$, NIC e SS, foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Os grupos sem periodontite, Controle e DM, apresentaram médias semelhantes para os parâmetros clínicos, enquanto que os grupos DP e DP+DM não tiveram diferenças estatisticamente significantes entre eles ($p > 0,05$). Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas somente quando os grupos DP e DP+DM foram comparados ao grupo Controle ou ao grupo DM.

Os grupos Controle e DM mostraram ausência ou poucos sinais de inflamação ($SS=0,1 \pm 0,1$ e $1,2 \pm 0,4$ respectivamente) e ausência de bolsas periodontais; visto que para os grupos DP e DP+DM, inflamação e bolsas periodontais sempre estavam presentes. Altas médias de NIC nos grupos DP e DP+DM podem ser interpretadas como um indicador de periodontite. Embora as médias de PS não tenham sido altas nos grupos DP e DP+DM ($3,06 \pm 0,13$ e $2,83 \pm 0,17$ respectivamente), estes grupos mostraram vários sítios com bolsas periodontais de 4 a 6mm (PS4-6), caracterizando doença periodontal estabelecida (DP= $32,9 \pm 4,2$; DP+DM= $28,5 \pm 3,4$). Além disso, os grupos DP e DP+DM apresentaram periodontite crônica moderada, portanto, os pacientes apresentaram poucas bolsas periodontais ≥ 7 mm (PS ≥ 7), PD= $4,7 \pm 1,1$; DP+DM= $5,5 \pm 2,2$.

3.2 Concentração das Proteínas Salivares

As concentrações de IL-6 e OPG estão apresentadas em picograma por mililitro (pg/ml) de saliva, e as concentrações de MMP-8 em nanograma por mililitro (ng/ml) de saliva no Gráfico 1. O limite de detecção foi 3.13 - 300 pg/ml para IL-6, 62.5 - 4000 pg/ml para MMP-8 e OPG.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos para as três proteínas salivares, com IL-6 ($p=0,006$); MMP-8 ($p=0,004$) e OPG ($p=0,032$). Em relação a IL-6, o grupo Controle mostrou a média da concentração significativamente menor que as médias dos grupos DP e DP+DM, enquanto que a média do grupo DM foi significativamente menor só quando comparada ao grupo DP+DM. Para MMP-8, a concentração do grupo Controle foi significativamente menor que a dos outros grupos e nenhuma diferença entre os grupos doentes (DP, DM e DP+DM) foi detectada. A média da concentração de OPG

foi estatisticamente diferente entre os grupos Controle e DM, e DP e DM (Tabela 2). Somente as amostras que ficaram dentro do limite de detecção para o ensaio foram consideradas nas análises estatísticas.

As concentrações de Proteína Total estão apresentadas em miligrama por mililitro (mg/ml) de saliva no Gráfico 2. Somente os grupos Controle e DP+DM apresentaram diferenças estatisticamente significantes, $p=0.003$.

3.3 Parâmetro Metabólico

A variação normal para saúde dos níveis de HbA1c é de 4,5 – 6%. No presente estudo, os níveis de HbA1c foram 7,8% para o grupo DM e 8,5% para o grupo DP+DM, sem diferença estatisticamente significativa entre eles ($p=0,052$). Estes dados também mostraram que o grupo DP+DM apresentou inadequado controle glicêmico.

3.4 Correlação entre Parâmetros Clínicos e Proteínas Salivares

Para o grupo Controle, os dados mostraram uma correlação negativa entre as concentrações de MMP-8 com PS \leq 3 ($r= -0,62$; $p=0,054$) e com n. dentes ($r= -0,64$; $p=0,047$) (Tabela 3). No grupo DP, os parâmetros clínicos n. dentes e SS foram correlacionados com as concentrações salivares de IL-6 ($r= -0,44$; $p=0,036$ e $r=0,48$; $p=0,020$ respectivamente). No mesmo grupo, PS \geq 7 correlacionou-se com elevadas concentrações de MMP-8 ($r=0,46$; $p=0,030$) e o parâmetro SUP, com OPG salivar ($r= -0,55$; $p=0,018$) (Tabela 4). Para os grupos DM e DP+DM, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada com os parâmetros clínicos (Tabelas 5 e 6 respectivamente).

3.5 Correlação entre Parâmetro metabólico e Parâmetros Clínicos e Proteínas Salivares

Os dados mostraram que HbA1c teve correlação estatisticamente significativa com alguns parâmetros clínicos como PS ($r=0,31$; $p=0,049$), $PS\leq 3$ ($r= -0,39$; $p=0,013$), NIC ($r=0,36$; $p=0,022$) e n. dentes ($r= -0,40$; $p=0,011$) nos grupos DM e DP+DM (Tabela 7). Em relação às proteínas salivares, somente a IL-6 foi correlacionada positivamente com HbA1c ($r=0,54$; $p<0,000$) (Tabela 8).

Tabela 1. Parâmetros clínicos e idade (média \pm erro padrão) dos grupos

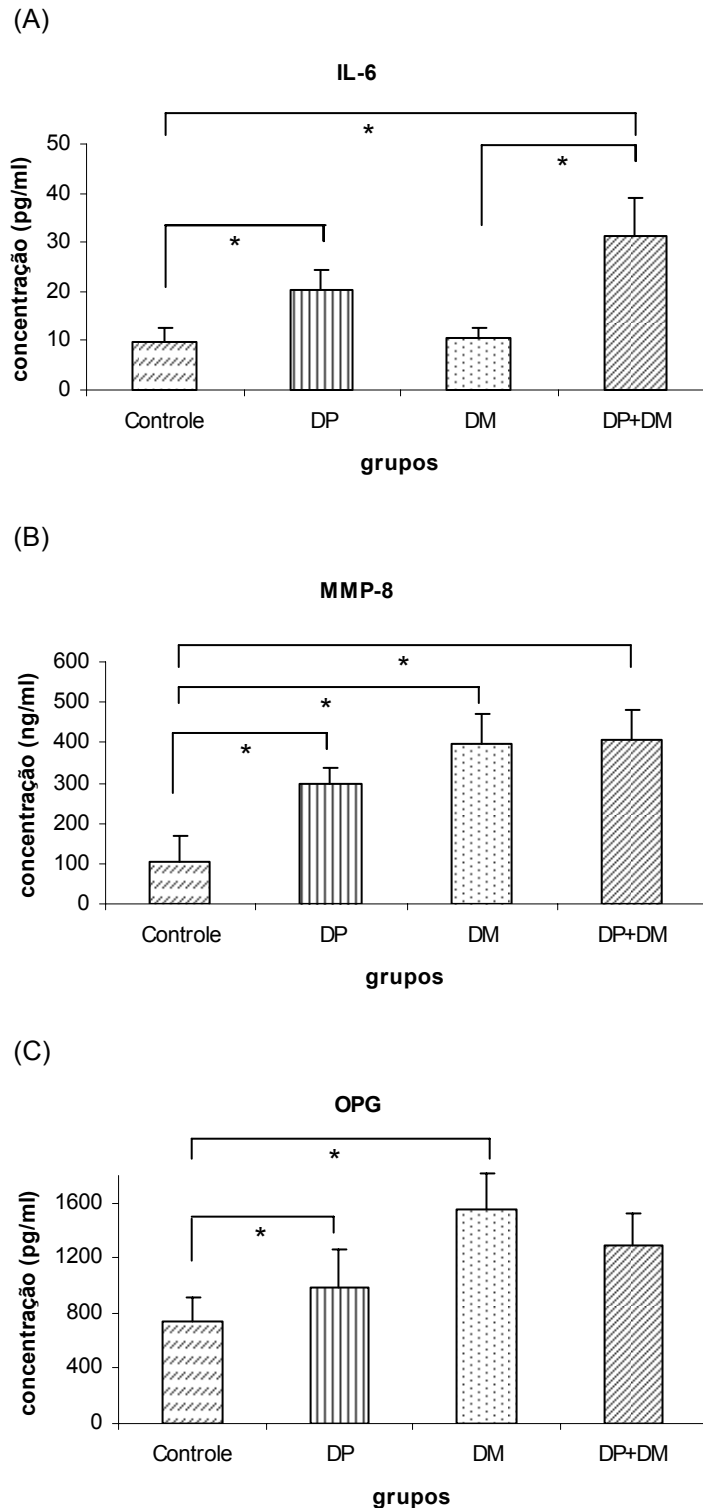
Parâmetros Clínicos	grupo Controle	grupo DP	grupo DM	grupo DP+DM	p
Idade (anos)	43,7 \pm 1,6 ^a	45,4 \pm 1,2 ^b	53,3 \pm 2,0 ^{a,b,c}	47,8 \pm 1,4 ^c	0,002*
PS (mm)	2,05 \pm 0,06 ^{a,b}	3,06 \pm 0,13 ^{a,c}	2,11 \pm 0,03 ^{c,d}	2,83 \pm 0,17 ^{b,d}	<0,000*
PS\leq3 (sítios)	158,3 \pm 4,1 ^{a,b}	103,6 \pm 5,5 ^{a,c}	140,4 \pm 5,9 ^{c,d}	95,1 \pm 6,2 ^{b,d}	<0,000*
PS4-6 (sítios)	0 ^{a,b}	32,9 \pm 4,2 ^{a,c}	0 ^{c,d}	28,5 \pm 3,4 ^{b,d}	<0,000*
PS\geq7 (sítios)	0 ^{a,b}	4,7 \pm 1,1 ^{a,c}	0 ^{c,d}	5,46 \pm 2,2 ^{b,d}	<0,000*
NIC (mm)	2,09 \pm 0,06 ^{a,b}	3,82 \pm 0,22 ^{a,c}	2,21 \pm 0,03 ^{c,d}	3,81 \pm 0,25 ^{b,d}	<0,000*
n. dentes	26,4 \pm 0,7 ^a	23,7 \pm 0,5	23,4 \pm 1,0	21,5 \pm 0,9 ^a	<0,000*
SS (%)	0,1 \pm 0,1 ^{a,b}	19,0 \pm 4,2 ^{a,c}	1,2 \pm 0,4 ^c	15,0 \pm 5,4 ^b	<0,000*
SUP (%)	0	1 \pm 0,0	0	0,3 \pm 0,2	NS

*p é estatisticamente significativa para análise Kruskal-Wallis One Way.

NS: diferença estatisticamente não significativa para análise Kruskal-Wallis One Way.

Para o teste Mann-Whitney, níveis conectados pela mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Gráfico 1. Concentrações das proteínas salivares dos grupos determinadas pelo ELISA



(A) Comparação da concentração (pg/ml) de Interleucina-6 (IL-6) na saliva determinada pelo ELISA; para análise Kruskal-Wallis One Way, $p=0,006$. (B) Comparação da concentração (ng/ml) de Metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8) na saliva determinada pelo ELISA; análise Kruskal-Wallis One Way, $p=0,004$. (C) Comparação da concentração (pg/ml) de Osteoprotegerina (OPG) na saliva determinada pelo ELISA; análise Kruskal-Wallis One Way, $p=0,032$.

* Para o teste Mann-Whitney, groups connected are significantly different ($p<0,05$).

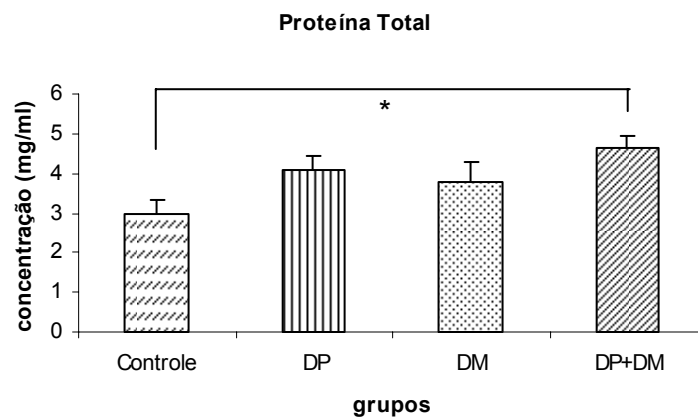
Tabela 2. Concentrações das proteínas salivares (média ± erro padrão) dos grupos determinadas pelo ELISA

Proteínas Salivares	grupo Controle	grupo DP	grupo DM	grupo DP+DM	p
IL-6 (pg/ml)	9,81±2,70 ^{a,b}	20,22±4,00 ^a	10,50±1,91 ^c	31,14 ± 7,99 ^{b,c}	0,006*
MMP-8 (ng/ml)	104,17±64,30 ^{a,b,c}	296,35±43,22 ^a	395,88±75,22 ^b	406,961±75,79 ^c	0,004*
OPG (pg/ml)	740,22±177,09 ^a	982,02±274,15 ^b	1552,58±254,84 ^{a,b}	1284,83±240,14	0,032*

*p é estatisticamente significante para análise Kruskal-Wallis One Way.

Para o teste Mann-Whitney, níveis conectados pela mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Gráfico 2. Comparação das concentrações salivares da Proteína Total (mg/ml) entre os grupos, determinadas por ELISA



Para análise Kruskal-Wallis One Way, $p=0,042$.

* Para o teste Mann-Whitney, níveis conectados pela mesma letra são significativamente diferentes ($p<0,05$).

Tabela 3. Correlações entre parâmetros clínicos e proteínas salivares do grupo Controle

Parâmetros Clínicos	Proteínas Salivares					
	IL-6		MMP-8		OPG	
	r	p	r	p	r	p
PS	0,07	NS	0,11	NS	0,18	NS
PS≤3	-0,39	NS	-0,62	0,050*	0,01	NS
PS4-6	**		**		**	
PS≥7	**		**		**	
NIC	0,04	NS	0,10	NS	0,20	NS
n. dentes	-0,39	NS	-0,64	0,047*	0,01	NS
SS	0,22	NS	0,34	NS	-0,11	NS
SUP	**		**		**	

*p é estatisticamente significativa para correlação não-paramétrica de Spearman ($p < 0,05$).

r: valor da correlação.

NS: diferença estatisticamente não significativa para correlação não-paramétrica de Spearman.

**Variáveis não testadas devido à ausência dos parâmetros clínicos.

Tabela 4. Correlações entre parâmetros clínicos e proteínas salivares do grupo DP

Parâmetros Clínicos	Proteínas Salivares					
	IL-6		MMP-8		OPG	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
PS	0,00	NS	0,32	NS	-0,05	NS
PS≤3	-0,13	NS	-0,38	NS	-0,11	NS
PS4-6	-0,06	NS	0,32	NS	0,04	NS
PS≥7	0,11	NS	0,46	0,030*	0,00	NS
NIC	0,11	NS	0,36	NS	0,06	NS
n. dentes	-0,44	0,036*	-0,25	NS	-0,20	NS
SS	0,48	0,020*	-0,17	NS	-0,00	NS
SUP	-0,32	NS	-0,01	NS	-0,55	0,018*

**p* é estatisticamente significativa para correlação não-paramétrica de Spearman ($p < 0,05$).

r: valor da correlação.

NS: diferença estatisticamente não significativa para correlação não-paramétrica de Spearman.

Tabela 5. Correlações entre parâmetros clínicos e proteínas salivares do grupo DM

Parâmetros Clínicos	Proteínas Salivares					
	IL-6		MMP-8		OPG	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
PS	0,36	NS	0,15	NS	0,25	NS
PS≤3	-0,18	NS	-0,05	NS	0,21	NS
PS4-6	**		**		**	
PS≥7	**		**		**	
NIC	0,39	NS	0,15	NS	0,17	NS
n. dentes	-0,18	NS	-0,05	NS	0,21	NS
SS	0,06	NS	0,31	NS	0,07	NS
SUP	**		**		**	

r: valor da correlação.

NS: diferença estatisticamente não significativa para correlação não-paramétrica de Spearman.

**Variáveis não testadas devido à ausência dos parâmetros clínicos.

Tabela 6. Correlações entre parâmetros clínicos e proteínas salivares do grupo DP+DM

Parâmetros Clínicos	Proteínas Salivares					
	IL-6		MMP-8		OPG	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
PS	0,02	NS	-0,22	NS	-0,20	NS
PS≤3	0,12	NS	-0,06	NS	0,33	NS
PS4-6	0,01	NS	-0,06	NS	0,02	NS
PS≥7	0,08	NS	-0,06	NS	-0,02	NS
NIC	0,07	NS	0,09	NS	-0,13	NS
n. dentes	-0,10	NS	-0,31	NS	0,21	NS
SS	-0,04	NS	-0,17	NS	0,15	NS
SUP	0,21	NS	-0,17	NS	0,32	NS

r: valor da correlação.

NS: diferença estatisticamente não significativa para correlação não-paramétrica de Spearman.

Tabela 7. Correlações entre níveis de HbA1c e parâmetros clínicos dos grupos DM e DP+DM

Parâmetros clínicos	HbA1c	
	r	p
PS	0,31	0,049*
PS≤3	-0,39	0,013*
PPD 4-6	0,24	NS
PPD≥7	0,28	NS
NIC	0,36	0,022*
SUP	0,25	NS
SS	0,10	NS
n. dentes	-0,40	0,011*

*p é estatisticamente significativa para correlação não-paramétrica de Spearman ($p < 0,05$).

r: valor da correlação.

NS: diferença estatisticamente não significativa para correlação não-paramétrica de Spearman.

Tabela 8. Correlações entre níveis de HbA1c e proteínas salivares dos grupos DM e DP+DM

Proteínas salivares	HbA1c	
	r	p
IL-6	0,54	<0,000*
MMP-8	0,22	NS
OPG	-0,13	NS

**p* é estatisticamente significativa para correlação não-paramétrica de Spearman ($p < 0,05$).

r: valor da correlação.

NS: diferença estatisticamente não significativa para correlação não-paramétrica de Spearman.

4 DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Estudos anteriores verificaram a relação entre o diabetes e a periodontite como sendo bidirecional, sugerindo que o diabetes é um fator de risco à periodontite³ assim como o tratamento periodontal pode ter influência sobre o controle glicêmico²⁶.

Os dados desse estudo demonstraram que as concentrações de IL-6 são mais altas em locais que apresentam inflamação periodontal (pacientes dos grupos DP e DP+DM) em comparação a locais sem inflamação (grupos Controle e DM). Além disso, os dados mostraram elevada concentração de MMP-8 e OPG em amostras de saliva de pacientes diabéticos (grupos DM e DP+DM).

No presente estudo, a análise dos dados sugeriu que altas concentrações de IL-6 na saliva de pacientes periodontais (grupos DP e DP+DM) podem ser relevantes para a modulação da periodontite, como indicado pelos parâmetros clínicos destes grupos. A detecção de elevadas concentrações de IL-6 na saliva de pacientes com periodontite foi consistente com as concentrações observadas por Kurtis et al.²⁷ e Mengel et al.²⁸. As concentrações de IL-6 foram positivamente correlacionadas com SS e negativamente com o n. dentes no grupo DP, concordando com o fato de que esta citocina está associada às respostas inflamatórias crônicas¹¹ e ao aumento da reabsorção óssea, o que pode provocar a perda dentária¹². Em contraste, as concentrações salivares de IL-6 não estavam associadas aos parâmetros clínicos do grupo Controle.

A formação de AGEs tem sido relatada como tendo um importante papel na modulação da expressão de citocinas, como IL-6, em pacientes diabéticos²⁹. Contudo, nossos resultados apresentaram menores concentrações de IL-6 em

amostras do grupo DM, e nenhuma significância estatística entre os grupos DP e DP+DM foi encontrada. Uma razoável explicação para esses resultados pode ser em relação ao tratamento do diabetes tipo 2 com insulina, que reduz os efeitos da IL-1 e da IL-6³⁰. Outra possível explicação seria que as concentrações reduzidas de IL-6 no grupo DM podem ser um mecanismo compensatório pelas concentrações de outras citocinas estarem aumentadas devido à ação dos AGEs. Dessa forma, o monitoramento de um amplo grupo de citocinas poderia explicar esse fenômeno. Adicionalmente, segundo O'Connell et al.³¹, os níveis de HbA1c estão relacionados com a concentração de alguns biomarcadores. Em acordo com esse estudo, nossos resultados mostraram uma correlação positiva entre a concentração de IL-6 e os níveis de HbA1c. Desse modo, nossos achados sugerem que a IL-6 salivar pode ser testada como um sensível marcador para a inflamação periodontal.

Em relação à MMP-8, esta proteína é um dos principais participantes no colapso do colágeno durante a destruição periodontal e pode estar presente no fluido crevicular gengival e na saliva³². Assim como nos estudos de Miller et al.¹⁹ e Christodoulides et al.³³, a concentração de MMP-8 foi maior em amostras de saliva de pacientes com periodontite (DP e DP+DM) quando ao grupo Controle. Também de acordo com estes autores^{19,33}, a média de MMP-8 teve correlação inversa com PS \leq 3 e o n. dentes no grupo controle, indicando que quanto mais sítios saudáveis e dentes o paciente possuir, menor será a concentração da MMP-8. Por outro lado, a média da MMP-8 teve uma correlação positiva com PS \geq 7 no grupo DP. A detecção de MMP-8 salivar e as correlações entre suas concentrações e alguns parâmetros clínicos estão de acordo com Chen et al.¹⁶, que sugere que a MMP-8 tem um importante papel no monitoramento da periodontite.

Entretanto, nossos dados também mostraram concentrações elevadas de MMP-8 nas amostras de saliva de pacientes diabéticos com ou sem periodontite (grupos DM e DP+DM). De acordo com a literatura^{34,35}, o diabetes tem sido associado ao metabolismo alterado do colágeno. O estudo de Collin et al.³⁴ mostrou que a maioria das MMPs na saliva de pacientes diabéticos do tipo 2 são MMP-8 e MMP-9. Além disso, Sorsa et al.³⁶ relataram que a concentração aumentada de MMP-8 nos pacientes diabéticos era independente dos fatores bacterianos, indicando que a concentração de MMP-8 nestes pacientes pode não estar relacionada somente à periodontite. Dessa forma, embora a literatura relate que a MMP-8 possa ser um marcador para a periodontite, o diabetes pode superestimar os valores desta MMP.

Altas concentrações de OPG foram detectadas em amostras de saliva de pacientes diabéticos (grupos DM e DP+DM). Uma possibilidade é que os níveis séricos de glicose ou proteínas glicadas afetem o ensaio para a OPG³⁷, mas não encontramos correlação entre as concentrações de OPG e níveis de HbA1c nos pacientes diabéticos, sugerindo que esta pode não ser uma explicação razoável. Outra hipótese é que as concentrações de OPG refletem a presença de doenças vasculares em curso, o que é uma complicação comum no diabetes³⁷. Recentemente, concentrações plasmáticas elevadas de OPG foram relatadas em pacientes diabéticos tipo 2 e foram associadas a complicações microvasculares e a doença assintomática das artérias coronais assim como a função endotelial prejudicada³⁸. Alguns estudos^{39,40} sugeriram que concentrações elevadas de OPG representam um incompleto mecanismo de defesa contra outros fatores que promovam a calcificação arterial, aterosclerose e outras formas de dano vascular; atuando como uma importante molécula reguladora na vasculatura. Os resultados

do presente estudo são similares aos dados de pacientes com diabetes tipo 2 como previamente relatado por Browner et al.³⁷ e Xiang et al.³⁸, sugerindo que a OPG pode afetar os estágios iniciais da aterosclerose em pacientes diabéticos.

Além disso, os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre a concentração de OPG no grupo DP e no grupo Controle, confirmando os resultados de OPG encontrados por Miller et al.¹⁹. Parece que a concentração de OPG na saliva não está bem definida na saúde ou doença. O papel da OPG no metabolismo ósseo leva à hipótese de que suas concentrações estariam aumentadas em circunstâncias que requeiram a inibição da osteoclastogênese. Um dos possíveis mecanismos biológicos atuantes é que um aumento nos precursores dos osteoclastos possa levar a uma regulação aumentada da OPG. Por sua vez, a OPG inibiria um aumento no número dos precursores de osteoclastos. Contudo, durante a destruição periodontal, pode haver um limiar onde a OPG está operando em sua capacidade máxima, mas não consegue superar o número excessivo de precursores de osteoclastos, o que resultaria em remodelação óssea¹⁹. Uma vez que a periodontite tem períodos de remissão, a remodelação óssea talvez não estivesse em curso durante a amostragem deste estudo. Isto pode explicar a menor concentração média de OPG no grupo DP quando comparado ao grupo Controle. Assim sendo, a OPG pode não ser o marcador mais apropriado para avaliar a reabsorção óssea ativa na periodontite.

O teste da hemoglobina glicada (HbA1c) mede a quantidade de glicose irreversivelmente ligada à molécula da hemoglobina, sendo também utilizado como um instrumento de monitoração do controle glicêmico no diabetes⁴¹. Os pacientes DM apresentaram níveis glicêmicos pouco acima do limite do controle adequado do diabetes, mas no grupo DP+DM, a média da HbA1c indicou um controle glicêmico

inadequado. Os estudos de Novaes et al.^{42, 43} mostraram que o diabetes não-controlado ou mal controlado está associado com uma maior susceptibilidade a infecções orais, incluindo a periodontite. Por outro lado, a presença de periodontite pode agravar o controle glicêmico⁴⁴. Em um estudo longitudinal⁴⁴, pacientes com diabetes tipo 2 e com periodontite severa demonstraram um controle glicêmico inadequado quando comparados aos pacientes diabéticos com destruição periodontal mínima. No presente estudo, os dados mostraram correlação positiva entre os níveis de HbA1c e alguns parâmetros clínicos (PS, NIC) e correlação inversa com $PS \leq 3$ e com o n. dentes nos grupos DM e DP+DM. Contudo, não há como saber se os níveis altos de HbA1c interferiram na periodontite ou vice-versa.

O teste ELISA para RAGE foi realizado, mas não foi possível detectar a concentração da RAGE na saliva usando o kit Human Quantikine RAGE ELISA^γ. Yoon et al.⁴⁵ caracterizaram os AGEs na saliva de pacientes diabéticos com espectroscopia de ressonância magnética nuclear, mas não os RAGEs. Katz et al.⁴⁶ analisaram os AGEs na periodontite usando imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) em biópsias gengivais.

A concentração total de proteínas salivares apresenta-se similar nos pacientes diabéticos⁴⁷, periodontais⁴⁸ e nos indivíduos controle. No presente estudo, a concentração total de proteínas salivares foi dosada a fim de checar se havia discrepâncias entre os grupos que pudessem comprometer os resultados dos biomarcadores específicos; contudo, esse comprometimento não foi verificado. Foi possível observar que as maiores concentrações no grupo DP+DM, quando comparado ao grupo Controle, podem ser explicadas por elevado conteúdo de

^γ Human Quantikine RAGE ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA

proteínas que se originam a partir da ativação do mecanismo de defesa do hospedeiro contra o processo inflamatório⁴⁸.

A pequena diferença na concentração total de proteína salivar entre os grupos pode também estar relacionada ao fluxo salivar que varia entre os pacientes e nos próprios pacientes. Algumas medicações afetam o fluxo salivar assim como doenças sistêmicas¹⁹. Mudanças no fluxo salivar podem apresentar um impacto significativo na concentração de proteínas na saliva. Ainda, a composição de saliva estimulada e não-estimulada difere, o que pode afetar as proteínas de interesse⁴⁹. No presente estudo, a saliva total foi coletada de forma não-estimulada como realizado em outros estudos semelhantes^{19,23,50}. Dodds et al.⁴⁷ mostraram que o fluxo salivar total estimulado e não-estimulado não foi afetado pelo estado do diabetes ou pelo controle do nível glicêmico.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- Dentro dos limites do presente estudo, os dados indicam que a saliva é um identificador adequado dos biomarcadores inflamatórios da periodontite com ou sem diabetes.
- Os dados suportam que a IL-6 é um biomarcador candidato da periodontite associada ou não ao diabetes na saliva.
- A análise dos resultados sugere que OPG e MMP-8 não são marcadores mais indicados para determinar o colapso periodontal, pois não foi possível diferenciar, por estes marcadores, os quadros de periodontite e de periodontite associada ao diabetes.
- Alternativamente, outros biomarcadores inflamatórios devem ser avaliados para a susceptibilidade individual à periodontite bem como para o diagnóstico da periodontite associada ou não ao diabetes.
- Baseado nestes achados, sugere-se que o papel do diabetes na modulação da periodontite pode envolver a super-expressão da MMP-8 e da OPG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol* 1997;107:347-352.
2. Lu HK, Chen YL, Li CL, Kuo MYP. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2006;41:354-360.
3. Papapanou PN. World Workshop in Clinical Periodontics. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996;1:1-36.
4. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998;3:30-39.
5. Duarte PM, Neto JBC, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis* 2007;13:594-599.
6. Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis. *J Dent Res* 1981;60:729-730.
7. Gomes MAB, Rodrigues FH, Afonso-Cardoso SR, et al. Levels of immunoglobulin A1 and Messenger RNA for interferon γ and tumor necrosis factor α in total saliva from patients with diabetes mellitus type 2 with chronic periodontal disease. *J Periodont Res* 2006;41:177-183.
8. Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol* 2000 2002;29:31-69.

9. Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol* 2000 2004;34:22-33.
10. Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005; 49(3):551-571.
11. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res & Ther* 2006;8(2):S3.
12. Cronstein BN. Interleukin-6: A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Dis* 2007;65(1):S11-15.
13. Mogi M, Otagoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1 β , interleukin 6, b2-microglobulin, and transforming growth factor- α in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1999;44:535-539.
14. Buduneli E, Vardar-Sengul S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 γ 2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol* 2007;78:127-134.
15. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. *J Biolog Chem* 1997;272:31504-31509.
16. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H. Matrix metalloproteinases-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2000;27:366-369.
17. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.

18. Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WMM, Macpherson LMD. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2007;34:271-277.
19. Miller CS, King CP Jr, Langub C, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease. A cross-sectional study. *JADA* 2006;137(5):7-16.
20. Ng PYB, Donley M, Hausmann E, Hutson AD, Rossomando E, Scannapieco FA. Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and *in vitro* studies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;49:252-260.
21. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis – a review. *J Clin Periodontol* 2000;27:453-465.
22. Pellegrini GG, Gonzales CM, Somoza JC, Friedman SM, Zeni SN. Correlation between salivary and serum markers of bone turnover in osteopenic rats. *J Periodontol* 2008;79:158-165.
23. Ito T, Komiya-Ito A, Arataki T, et al. Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis. *J Periodontol* 2008;79:316-322.
24. Machtei EE, Christersson LA, Grossi SG, Dunford R, Zambon JJ, Genco RJ. Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". *J Periodontol* 1992;63(3):206-214.
25. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci* 1993;694:72-77.
26. Rodrigues DC, Taba M Jr, Novaes AB Jr, Souza SL, Grisi MF. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol* 2003;74:1361-1367.
27. Kurtis B, Develioglu H, Taner IL, Balos K, Tekin IO. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. *J Oral Sci* 1999;41:163-167.

28. Mengel R, Bacher M, Flores-de-Jacoby L. Interactions between stress, interleukin-1 β , interleukin-6 and cortisol in periodontally diseased patients. *J Clin Periodontol* 2002;29:1012-1022.
29. Lalla E, Lamster IB, Feit M, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;105(8):1117-1124.
30. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:74-80.
31. O'Connell PA, Nomizo A, Foss MC, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol* 2008. In press.
32. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23(12):1127-1132.
33. Christodoulies N, Floriano PN, Miller CS, et al. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:411-428.
34. Colin HL, Sorsa T, Meurman JH, et al. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res* 2000;35(5):259-265.
35. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol* 2006;77(11):1803-1808.
36. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, et al. Cellular source and tetracycline inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1992;19:146-149.

37. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of Serum Osteoprotegerin Levels with Diabetes, Stroke, Bone Density, Fractures, and Mortality in Elderly Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(2):631-637.
38. Xiang GD, Xu L, Zhao LS, Yue L, Hou J. The relationship between plasma osteoprotegerin and endothelium-dependent arterial dilation in type 2 diabetes. *Diabetes* 2006;55:2126-2131.
39. Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 2001;358:257-259.
40. Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106(10):1192-1194.
41. Scannapieco FA. Periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *J Periodontol* 1998;69:841-850.
42. Novaes AB Jr, Pereira ALA, Moraes N, Novaes AB. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. *J Periodontol* 1991;62:116-122.
43. Novaes AB Jr, Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I – Probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J* 1996;7(2):65-73.
44. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996;67(10 Suppl):1085-1093.
45. Yoon M-S, Jankowski V, Montag S, et al. Characterisation of advanced glycation endproducts in saliva from patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323(2):377-381.

46. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol* 2005;32:40-44.
47. Dodds MWJ, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28:371-381.
48. Ozmeric N, Elgun S, Uraz A. Salivary arginase in patients with adult periodontitis. *Clin Oral Invest* 2000; 4:21-24.
49. Polland KE, Higgins F, Orchardson R. Salivary flow rate and pH during prolonged gum chewing in humans. *J Oral Rehabil* 2003; 30:861-865.
50. Ulker EA, Tulunoglu O, Ozmeric N, Can M, Demirtas S. The evaluation of cystatin C, IL-1 β , and TNF- α levels in total saliva and gingival crevicular fluid from 11- to 16-year-old children. *J Periodontol* 2008; 79: online early.

ARTIGO EM INGLÊS

Salivary Biomarkers of Periodontal Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Priscila P Costa*

Mario Taba Jr.*

Glauce L Trevisan*

Viviane K S Kawata*

Guilherme O Macedo*

Arthur B Novaes Jr.*

Sergio L S Souza*

Marcio F M Grisi*

Daniela B Palioto*

*Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry.

Number of figures and tables: 02 figures and 03 tables

Running title: Salivary Biomarkers in Periodontal Patients

Correspondence: Mario Taba Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, post code: 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@forp.usp.br; fax number: 55 16 36024788.

One-Sentence Summary

This study found that saliva is an adequate identifier of biomarkers for periodontitis. Also, the IL-6 concentration was higher in periodontal patients with or without diabetes supporting that IL-6 may be a candidate periodontal biomarker in saliva. The MMP-8 and OPG concentrations were higher in diabetic patients and it is not possible to distinguish the condition of periodontitis and periodontitis associated to diabetes by both markers. Therefore, OPG and MMP-8 may be not the most appropriate markers for periodontitis.

ABSTRACT

Background: Association of diabetes and periodontitis produces an inflammatory proteins discharge that can be reflected in saliva. The aim of this study was to measure salivary concentrations of interleukin-6 (IL-6), matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and osteoprotegerin (OPG) in patients with chronic periodontitis associated or not to type 2 diabetes mellitus.

Methods: A total of 90 subjects was divided in four groups: healthy (Control, n=22), patients with Periodontal Disease (PD, n=24), Diabetes Mellitus only (DM, n=20), Periodontal Disease and Diabetes Mellitus (PD+DM, n=24). Clinical and metabolic data were recorded. Non-stimulated saliva samples were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: Significant differences were detected between groups for the biomarkers ($p<0.05$). Regarding IL-6, significant differences were found comparing Control with PD and with PD+DM, and comparing PD+DM with DM groups ($p<0.005$). For MMP-8, the concentrations mean of the Control group was significantly lower than all the diseased groups ($p<0.01$), and no differences between diseased groups were detected. For OPG, significant differences were found between Control and PD, and between Control and DM groups ($p<0.05$). All clinical parameters were significant between groups ($p<0.001$), except suppuration. In PD group, BOP (bleeding on probing) showed positive correlation with IL-6 concentrations ($r=0.48$; $p<0.05$), PPD \geq 7 (pocket depth \geq 7mm) correlated positively with MMP-8 concentrations ($r=0.46$; $p<0.05$), also HbA1c levels correlated positively with IL-6 concentrations ($r=0.54$; $p<0.000$).

Conclusion: Saliva is an adequate substrate for inflammatory biomarkers identification in periodontal patients. IL-6 is a candidate biomarker for periodontitis and periodontitis associated to diabetes in the saliva.

Key words: Periodontitis, Diabetes mellitus; Saliva; Biomarkers

INTRODUCTION

Periodontitis is an inflammatory disease which results from an imbalance in the interactions between the periodontal microflora and the multifaceted response of the host's immune system¹. This imbalance causes the overexpression of proinflammatory cytokines and the subsequent destruction of connective tissue attachment and alveolar bone².

Evidences demonstrate that diabetes is a risk factor for periodontitis³. Diabetes mellitus is a metabolic disorder, characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion or insulin action⁴. It has been shown that hyperglycemia may glycate body proteins, forming advanced glycation end products (AGEs). The AGEs in the periodontium stimulates monocytes recruitment to the site and interact with their receptors (RAGEs) on the cell surface of these monocytes. The AGE–RAGE interaction induces a change in monocyte phenotype, upregulating the cell and significantly increasing the production of proinflammatory cytokines⁵. In addition, diabetes may modulate periodontal tissue destruction by reducing the polymorphonuclear leukocyte function, including chemotaxis, adherence, and phagocytosis⁶.

Diabetes and periodontitis are common chronic diseases in adults. Both diseases are high prevalent in world's population, and it is estimated that 1 – 6% of the general population suffer from diabetes⁷. On the other hand, periodontal disease afflicts over 50% of the adult population in the United States⁸.

Traditional periodontal diagnosis includes clinical parameters and radiographs to assess alveolar bone level⁹. However, advances in the diagnosis of oral and periodontal diseases are moving toward methods whereby periodontal activity can be identified and quantified by objective measures such as biomarkers found in gingival

crevicular fluid, serum and saliva and can potentially be used as diagnostic markers¹⁰.

Interleukin-6 (IL-6) dictates the transition from acute to chronic inflammation by changing the nature of leucocyte infiltrate (from polymorphonuclear neutrophils to monocyte/macrophages), and it exerts stimulatory effects on T- and B-cells, favoring chronic inflammatory response¹¹. In addition, it stimulates mesenchymal progenitor cell differentiation toward the osteoblastic lineage, is a potent anti-apoptotic agent on osteoblastic cells, increasing bone resorption and induces production of matrix metalloproteinases¹². Thus, IL-6 may be a useful indicator or a diagnostic marker for periodontitis¹³.

Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major destructive metalloproteinase (MMP), implicated in the pathogenesis of periodontitis and is found in large amounts in gingival biopsies and oral fluids¹⁴. Polymorphonuclear neutrophil is one of the cells that produce MMP-8, although gingival fibroblasts can also express it¹⁵. Thus, literature suggests that MMP-8 plays an important role in monitoring periodontitis¹⁶.

Osteoprotegerin (OPG) is a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor family that is expressed by osteoblasts. The function of the OPG, a decoy receptor, is to reduce interaction between receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and the receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) since RANKL can potentially stimulate osteoclasts to induce bone resorption, and when blocked by OPG, the amount of bone resorption may be reduced¹⁷. A reasonable hypothesis is that the bone destruction seen in periodontitis is associated to a disturbance in the balance of RANKL and OPG, for example, elevated RANKL concentrations and/or lower OPG concentrations in fluids and tissues result in an excess amount of free RANKL capable of stimulating RANK, thereby increasing bone

resorption by osteoclasts. Some cytokines, such as interleukin (IL)-1 and IL-6, are known to modulate RANKL and OPG concentration¹⁸.

Saliva has the potential to be used as a diagnostic fluid for oral disease^{19,20}. It can also be easily collected, contains locally-derived and systemically-derived markers, and hence may offer the basis for a specific diagnostic test for periodontitis²¹. According to Pellegrini et al.²² and Ito et al.²³, quantifying biomarkers in saliva may serve as a useful tool to predict susceptibility to periodontitis, to provide information for disease severity and to monitor the effectiveness of periodontal therapy.

Considering the accumulated evidences and the necessity to further investigate the inflammatory biomarkers in periodontitis associated to diabetes, the aim of this study was to measure salivary concentration of IL-6, MMP-8 and OPG in patients with periodontitis associated or not to type 2 diabetes mellitus.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This study was carried out as a joint collaboration of the Department of Oral Surgery and Periodontology and the Department of Internal Medicine – Division of Endocrinology and Metabolism of the University of São Paulo. It was reviewed and approved by the Institutional Human Research Committee. All subjects were, on an individual basis, informed about the nature of the proposed study and informed consent forms were signed.

Subjects underwent anamnesis, clinical and radiographic examination. Diabetic patients had the glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels verified in the Endocrinology Clinical of University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Medicine. According to their periodontal condition and general health status, they were invited to participate in the study. Inclusion criteria were: (i) presence of at least 15 teeth; (ii) at least one site with probing depth ≥ 5 mm and two teeth with attachment loss ≥ 6 mm²⁴; (iii) to be 35 years or older. Exclusion criteria included: (i) use of antibiotics or periodontal treatment in the previous 6 months; (ii) smoking within the past 5 years; (iii) pregnancy or lactancy; (iv) concomitant medical therapy, except for diabetic condition; (v) presence of other inflammatory conditions; (vi) major diabetic complications.

A total of 90 subjects were divided in four groups: 22 Healthy subjects (Control), 24 patients with periodontal disease (PD), 20 patients with diabetes mellitus only (DM), 24 patients with periodontal disease and diabetes mellitus (PD+DM).

Clinical Parameters

Clinical examination was performed by a single experienced examiner and recorded at six sites per tooth with the aid of a computerized periodontal probe^δ. The parameters recorded were: probing pocket depth (PPD), relative clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), suppuration (SUP) and number of teeth (n. teeth).

Saliva Sample Collection

Non-stimulated whole expectorated saliva was collected (~3ml) from each subject's saliva into sterile tubes according to the method described by Navazesh²⁵. Subjects refrained from eating, drinking, and oral hygiene for 2 hours prior to saliva collection. Saliva samples were placed on ice immediately and aliquoted before freezing at -80°C.

Salivary Proteins Analysis

The salivary concentrations of IL-6, MMP-8, OPG and Total Protein were determined in duplicate for each subject using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Human IL-6, MMP-8, OPG and Total Protein assay kits^γ were used according to each manufacturer's instructions. A standard curve was constructed by using standards provided by the kits, and protein concentrations were calculated from the standard curve. For the Total Protein assay, bovine serum albumin was used as standard.

^δ Florida Probe®, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA

^γ Human Quantikine IL-6 ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA

^γ Human MMP-8/OPG DuoSet kit, R&D Systems, Minneapolis, USA

^γ Bio-Rad Bradford Total Protein Assay Kit, Bio-Rad, California, USA

Glycosylated Hemoglobin (HbA1c) Measurement

The HbA1c levels were analyzed for the metabolic assessment in diabetic patients (DM and PD+DM groups). The HbA1c data were measured by ion exchange chromatography HPLC (high-pressure liquid chromatography) and is expressed in percentage.

Statistical Analysis

Data were recorded as mean \pm standard deviation and the experimental unit was the subject. Kruskal-Wallis One Way Analysis and Mann-Whitney's test were applied to compare clinical parameters and concentration of salivary proteins between groups. Correlations between concentrations of salivary proteins, clinical parameters and HbA1c levels were measured by Spearman Nonparametric Correlation. Data were tested for normality before applying the adequate parametric or non-parametric tests. Statistical significance was considered at significance level of 5% ($p < 0.05$).

RESULT

Demographics and clinical characteristics

The clinical parameters, age, sex and salivary proteins concentrations were measured in saliva samples of 90 subjects: 22 Healthy, 24 patients with periodontal disease, 20 patients with diabetes mellitus only, 24 patients with periodontal disease and type 2 diabetes mellitus. Sixty were women and thirty were men.

Age and clinical parameters of the participants recruited for this study are summarized in Table 1. The mean age of the Control, PD and PD+DM groups were similar, 43.7 ± 1.6 , 45.4 ± 1.2 and 47.8 ± 1.4 , respectively. Only the mean age of the DM group was higher than the others groups, 53.3 ± 2.0 . Most of the subjects in this population had more than 20 teeth, with mean of 26.4 teeth for the Control group, 23.7 for the PD group, 23.4 for the DM group and 21.5 for the PD+DM group.

Regarding clinical parameters, only SUP was not different among all groups ($p=0.078$). Therefore, data showed that all other evaluated clinical parameters, PPD, $PPD \leq 3$, $PPD 4-6$, $PPD \geq 7$, CAL and BOP, were different among groups ($p < 0.05$). The groups without periodontitis, Control and DM, presented similar mean values for the clinical parameters while the PD and PD+DM groups had no significant differences between themselves ($p > 0.05$). Significant differences were found only when PD and PD+DM groups were compared to the Control group or to the DM group.

The Control and DM group showed no or few signs of inflammation (mean BOP = 0.1 ± 0.1 and 1.2 ± 0.4 respectively) and absence of periodontal pockets, whereas for both PD and PD+DM groups, inflammation and periodontal pockets were always present. Elevated means of CAL in the PD and PD+DM groups may be an indicator of periodontitis. Though the PPD mean value from the PD and PD+DM groups were not higher, 3.06 ± 0.13 and 2.83 ± 0.17 respectively, these groups

showed several sites with periodontal pockets from 4 to 6mm (PPD4-6), characterizing established periodontal disease ($PD=32.9 \pm 4.2$; $PD+DM=28.5 \pm 3.4$).

Concentration of salivary proteins

The mean concentrations of IL-6 and OPG are presented in picogram per milliliter (pg/ml) of saliva, and the mean concentrations of MMP-8 presented in nanogram per milliliter (ng/ml) of saliva (Figure 1). The detection limit was 3.13 - 300 pg/ml for IL-6 and 62.5 - 4000 pg/ml for MMP-8 and OPG.

Significant differences were found among all groups for the three screened salivary proteins, with IL-6 ($p=0.006$), MMP-8 ($p=0.004$) and OPG ($p=0.032$). Regarding IL-6, the Control group showed significantly lower mean concentration than PD and PD+DM groups, while for the DM group mean concentration was significantly lower only when compared to the PD+DM group. For MMP-8, the Control group concentration was significantly lower than the other diseased groups and no differences between diseased groups (PD, DM e PD+DM) were detected. The mean concentration of OPG was significantly different between Control and DM groups, and PD and DM groups. Only samples which stayed within the detection limit for the assay were considered for statistical analysis.

Mean concentrations of Total Protein are presented in miligram per milliliter (mg/ml) of saliva in Figure 2. Only Control and PD+DM groups presented statistically significant differences ($p=0.003$).

Metabolic parameter

The normal healthy range for the HbA1c levels is 4.5 – 6%. In the present study, the HbA1c mean values were 7.8% for the DM group and 8.5% for the PD+DM

group, without significant differences between diabetic groups ($p=0.052$). Also, these data show that principally PD+DM group presented inadequate glycemic control.

Correlation between clinical parameters and salivary proteins

For the Control group, data showed a negative correlation among MMP-8 concentrations with $PPD \leq 3$ ($r = -0.62$, $p=0.054$) and with n. teeth ($r = -0.64$, $p=0.047$). In PD group, the n. teeth and BOP clinical parameters were correlated with IL-6 concentrations ($r = -0.44$, $p=0.036$ and $r=0.48$, $p=0.020$ respectively). In the same group, $PPD \geq 7$ were correlated with elevated MMP-8 concentrations (correlation value= 0.46 ; $p=0.030$) and SUP parameter with OPG concentrations ($r = -0.55$; $p=0.018$). For the DM and PD+DM groups, no significant correlation to clinical parameters was found.

Correlation between metabolic parameter and clinical parameters and salivary proteins

Data showed that HbA1c had significant correlation to some clinical parameters such as PPD ($r=0.31$, $p=0.049$), $PPD \leq 3$ ($r = -0.39$, $p=0.013$), CAL ($r=0.36$, $p=0.022$) and n. teeth ($r = -0.40$, $p=0.011$) in DM and PD+DM groups (Table 2). Regarding salivary proteins, only IL-6 was positively correlated to HbA1c ($r=0.54$; $p<0.000$) (Table 3).

DISCUSSION

Previous studies support a bidirectional relationship between diabetes and periodontitis, suggesting that diabetes is a risk factor for periodontitis³ as well as the periodontal treatment may influence glycemic control²⁶.

Data from the current study demonstrated that salivary concentrations of IL-6 are higher in patients with periodontal inflammation (PD and PD+DM groups) in comparison to Control and DM group and elevated salivary concentrations of MMP-8 and OPG in saliva samples from diabetic patients (DM and PD+DM groups).

In the current study, results suggested that elevated IL-6 concentrations in the saliva of periodontal patients (PD and DM+PD groups) may be related to the modulation of periodontitis, indicated by the clinical parameters in these groups. This result was consistent to IL-6 concentrations reported by Kurtis et al.²⁷ and Mengel et al.²⁸. IL-6 concentrations were positively correlated to BOP and negatively to n. of teeth in PD group, corroborating that this proinflammatory cytokine is associated to chronic inflammatory responses¹¹ and to the increase in bone resorption¹². In contrast, IL-6 concentrations were not associated to clinical parameters in the Control group.

The formation of AGEs has been reported to play an important role in modulating cytokine expression as IL-6 in diabetic patients²⁹. However, results presented lower IL-6 concentrations in samples from the DM group, and no statistically significant differences between PD and PD+DM groups were found. A reasonable explanation for these results may be related to type 2 diabetes treatment with insulin which decreases IL-1 and IL-6 effects³⁰. Another explanation would be that lower IL-6 concentrations in the DM group may be a compensatory mechanism to increase others cytokines concentrations due AGEs action. Therefore, monitoring the large cytokines group may explain this phenomenon. In addition, O'Connell et al.³¹ study presented that HbA1c levels were

related to some biomarkers concentrations. In accordance to O'Connell et al.³¹, our results showed a positive correlation between IL-6 concentration and HbA1c levels. Thus our findings suggest that salivary IL-6 may potentially be used as a sensitive marker for periodontal inflammation.

Regarding MMP-8, it is one of the major players in collagen breakdown during periodontal destruction and may be present in gingival crevicular fluid and in saliva³². In line with Miller et al.¹⁹ and Christodoulides et al.³³, MMP-8 concentrations were higher in patients' saliva samples with periodontitis (PD and PD+DM) when compared to the Control group. Also, in accordance to these authors^{19,33}, MMP-8 mean had negative correlation with PPD \leq 3 and n. teeth in the Control group, indicating that the more teeth and healthy sites the patient has, the lower will be the MMP-8 concentration. On the other hand, MMP-8 mean had positive correlation to PPD \geq 7 in the PD group. Detection of salivary MMP-8 and the correlation between MMP-8 concentrations and some clinical parameters are in accordance with Chen et al.¹⁶ who suggests that MMP-8 has an important role in monitoring periodontitis.

However, data showed the highest concentrations of MMP-8 in saliva samples from diabetic patients (DM and PD+DM groups). According to literature^{34,35}, diabetes has been associated to altered collagen metabolism. The Collin et al. study³⁴ showed that the major MMPs in type 2 diabetic patients' saliva are MMP-8 and MMP-9. Besides, Sorsa et al.³⁶ reported that increased MMP-8 was independent of bacterial factors, indicating that its concentration in diabetic patients may be not related only to periodontitis. Though the literature reported that MMP-8 is a periodontitis marker, diabetes may overestimate this metalloproteinase values.

Elevated OPG concentrations were detected in saliva samples of diabetic patients (DM and PD+DM groups). One possibility is that serum glucose levels or

glycosylated proteins affect the assay for OPG³⁷, but we found no correlation between OPG concentrations and HbA1c levels in diabetic patients, suggesting that this may be an unlikely explanation. Another hypothesis is that concentrations of OPG reflect ongoing vascular disease, which is a common complication in patients with diabetes³⁷. Recently, increased OPG concentrations have been reported in type 2 diabetic patients and they were associated to microvascular complications and to asymptomatic coronary artery disease as well as with impaired endothelial function³⁸. Some studies^{39,40} suggested that increased OPG concentrations represent an incomplete defense mechanism against other factors that promote arterial calcification, atherosclerosis and other forms of vascular damage, acting as an important regulatory molecule in the vasculature. The results of the present study are similar to data from type 2 diabetic patients, as previously reported by Browner et al.³⁷ and Xiang et al.³⁸, suggesting that OPG might affect early stage atherosclerosis in diabetic patients.

Besides, the results did not show significant differences between OPG concentrations in the PD and Control groups corroborating to the results of Miller et al.¹⁹. It seems that OPG concentrations in saliva are not well-defined in health or disease. OPG's role in bone metabolism leads one to hypothesize that its concentration would be increased under circumstances which require inhibition of osteoclastogenesis. One of the possible biological mechanisms at work is that an increase in osteoclast precursors might lead to the upregulation of OPG. In turn, OPG would inhibit an increased number of osteoclast precursors. However, during periodontal destruction, there may be a threshold whereby OPG is operating at full capacity and yet cannot overcome the overwhelming number of osteoclast precursors; this would result in bone turnover¹⁹. Since periodontitis is episodic, bone turnover may not have been occurring in each patient at the time of sampling in this

study; this might explain why the mean concentration of OPG was slightly elevated in the PD group compared to the Control group. Alternatively, OPG may not be the most appropriate marker for assessment of active bone resorption in periodontitis.

Glycosylated hemoglobin (HbA1c) test measures the amount of glucose irreversibly bound to the hemoglobin molecule. It has been used as a monitoring tool⁴¹. The DM patients were slightly above diabetic control's boundary, but in the PD+DM group, the HbA1c mean indicated an inadequate metabolic control of diabetes. Studies by Novaes et al.^{42,43} showed that uncontrolled or poorly controlled diabetes is associated with increased susceptibility to oral infections, including periodontitis. On the other hand, the presence of periodontitis may aggravate glycemic control⁴⁴. In a longitudinal study⁴⁴, diabetic subjects with severe periodontitis demonstrated significantly inadequate glycemic control than diabetic subjects with minimal periodontal destruction. In the current study, data showed positive correlation between the HbA1c levels and some clinical parameters (PPD, CAL) and negative correlation to PPD \leq 3 and n. teeth in DM and PD+DM groups.

The ELISA for RAGE was run, but it was not possible to detect it in the saliva samples using the Human Quantikine RAGE ELISA kit^Y. Yoon et al.⁴⁵ characterized AGEs in saliva from patients with diabetes mellitus with Nuclear magnetic resonance spectroscopy, but not RAGEs. Katz et al.⁴⁶ analyzed this biomarker in periodontitis with immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in gingival biopsies.

Total salivary protein concentration has been found to be similar in diabetic⁴⁷, periodontal⁴⁸ and control subjects. In the present study, total salivary protein concentration was measured to verify if possible differences between groups would

^Y Human Quantikine IL-6/RAGE ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA

compromise results of specific biomarkers; however, compromising was not verified. In this study, the higher total protein concentration in PD+DM when compared to the Control group may be explained by the elevated protein content produced due to the activation of the host's defence mechanism against the inflammatory process⁴⁸.

Also, slight differences in total protein concentrations among groups may be related to the flow rate of saliva that varies within and between subjects. Some medications affect salivary flow rate as well as systemic diseases¹⁹. Changes in flow rate could have a significant impact on proteins concentration in saliva. Besides, the composition of stimulated and non-stimulated saliva differs, and this could affect the proteins of interest⁴⁹. In the present study, non-stimulated whole saliva was collected according to other studies^{19,23,50}. Dodds et al.⁴⁷ showed that unstimulated whole saliva flow rates were unaffected by diabetes status, or by the level of glycemic control.

Within the limits of the present study, data indicated that saliva is an adequate identifier of inflammatory biomarkers for periodontitis with or without diabetes mellitus diagnosis. These data support that IL-6 is a candidate biomarker of periodontal disease in saliva, and OPG and MMP-8 are not the most appropriate markers for assessment of active periodontal breakdown, since it is not possible to distinguish the condition of periodontitis and periodontitis associated to diabetes by OPG and MMP-8 markers. Alternatively, other inflammatory biomarkers should be evaluated for the diagnosis of periodontitis and periodontitis associated to diabetes as well as the individual susceptibility to this disease. Based on these findings, it can be speculated that the role of diabetes in modulating periodontitis may involve the overexpression of MMP-8 and OPG.

ACKNOWLEDGMENTS

We applied the sequence-determines-credit approach for the sequence of authors.

The study had the financial support of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 477428/2006-1 ABNJ & MTJ. Authors thank the kind assistance of Fabíola Singaretti de Oliveira from the Molecular Biology Laboratory of the University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry, Department of Oral Surgery and Periodontology, and of Maria Cristina Foss Freitas from the Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism of the University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Medicine and the postgraduates Priscila Brasil da Nóbrega, Ingrid Webb Josephson Ribeiro and Karina Kimiko Yamashina Pereira from Department of Oral Surgery and Periodontology of the University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry.

REFERENCES

1. Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol* 1997;107:347-352.
2. Lu HK, Chen YL, Li CL, Kuo MYP. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2006;41:354-360.
3. Papapanou PN. World Workshop in Clinical Periodontics. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996;1:1-36.
4. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998;3:30-39.
5. Duarte PM, Neto JBC, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis* 2007;13:594-599.
6. Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis. *J Dent Res* 1981;60:729-730.
7. Gomes MAB, Rodrigues FH, Afonso-Cardoso SR, et al. Levels of immunoglobulin A1 and Messenger RNA for interferon γ and tumor necrosis factor α in total saliva from patients with diabetes mellitus type 2 with chronic periodontal disease. *J Periodont Res* 2006;41:177-183.
8. Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol* 2000 2002;29:31-69.
9. Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol* 2000 2004;34:22-33.

10. Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005; 49(3):551-571.
11. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res & Ther* 2006;8(2):S3.
12. Cronstein BN. Interleukin-6: A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Dis* 2007;65(1):S11-15.
13. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1 β , interleukin 6, b2-microglobulin, and transforming growth factor- α in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1999;44:535-539.
14. Buduneli E, Vardar-Sengul S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 γ 2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol* 2007;78:127-134.
15. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. *J Biolog Chem* 1997;272:31504-31509.
16. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H. Matrix metalloproteinases-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2000;27:366-369.
17. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.
18. Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WMM, Macpherson LMD. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2007;34:271-277.

19. Miller CS, King CP Jr, Langub C, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease. A cross-sectional study. *JADA* 2006;137(5):7-16.
20. Ng PYB, Donley M, Hausmann E, Hutson AD, Rossomando E, Scannapieco FA. Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and *in vitro* studies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;49:252-260.
21. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis – a review. *J Clin Periodontol* 2000;27:453-465.
22. Pellegrini GG, Gonzales CM, Somoza JC, Friedman SM, Zeni SN. Correlation between salivary and serum markers of bone turnover in osteopenic rats. *J Periodontol* 2008;79:158-165.
23. Ito T, Komiya-Ito A, Arataki T, et al. Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis. *J Periodontol* 2008;79:316-322.
24. Machtei EE, Christersson LA, Grossi SG, Dunford R, Zambon JJ, Genco RJ. Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". *J Periodontol* 1992;63(3):206-214.
25. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci* 1993;694:72-77.
26. Rodrigues DC, Taba M Jr, Novaes AB Jr, Souza SL, Grisi MF. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol* 2003;74:1361-1367.
27. Kurtis B, Develioglu H, Taner IL, Balos K, Tekin IO. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. *J Oral Sci* 1999;41:163-167.
28. Mengel R, Bacher M, Flores-de-Jacoby L. Interactions between stress, interleukin-1 β , interleukin-6 and cortisol in periodontally diseased patients. *J Clin Periodontol* 2002;29:1012-1022.

29. Lalla E, Lamster IB, Feit M, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;105(8):1117-1124.
30. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:74-80.
31. O'Connell PA, Nomizo A, Foss MC, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol* 2008. In press.
32. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23(12):1127-1132.
33. Christodoulies N, Floriano PN, Miller CS, et al. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:411-428.
34. Colin HL, Sorsa T, Meurman JH, et al. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res* 2000;35(5):259-265.
35. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol* 2006;77(11):1803-1808.
36. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, et al. Cellular source and tetracycline inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1992;19:146-149.
37. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of Serum Osteoprotegerin Levels with Diabetes, Stroke, Bone Density, Fractures, and Mortality in Elderly Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(2):631-637.

38. Xiang GD, Xu L, Zhao LS, Yue L, Hou J. The relationship between plasma osteoprotegerin and endothelium-dependent arterial dilation in type 2 diabetes. *Diabetes* 2006;55:2126-2131.
39. Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 2001;358:257-259.
40. Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106(10):1192-1194.
41. Scannapieco FA. Periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *J Periodontol* 1998;69:841-850.
42. Novaes AB Jr, Pereira ALA, Moraes N, Novaes AB. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. *J Periodontol* 1991;62:116-122.
43. Novaes AB Jr, Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I – Probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J* 1996;7(2):65-73.
44. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996;67(10 Suppl):1085-1093.
45. Yoon M-S, Jankowski V, Montag S, et al. Characterisation of advanced glycation endproducts in saliva from patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323(2):377-381.
46. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues

- of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol* 2005;32:40-44.
47. Dodds MWJ, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28:371-381.
48. Ozmeric N, Elgun S, Uraz A. Salivary arginase in patients with adult periodontitis. *Clin Oral Invest* 2000; 4:21-24.
49. Polland KE, Higgins F, Orchardson R. Salivary flow rate and pH during prolonged gum chewing in humans. *J Oral Rehabil* 2003; 30:861-865.
50. Ulker EA, Tulunoglu O, Ozmeric N, Can M, Demirtas S. The evaluation of cystatin C, IL-1 β , and TNF- α levels in total saliva and gingival crevicular fluid from 11- to 16-year-old children. *J Periodontol* 2008; 79: online early.

TABLES

Table 1. Clinical and demographics parameters of the groups

Clinical Parameters	Control group	PD group	DM group	PD+DM group	<i>p</i>
Age	43.7 ± 1.6 ^a	45.4 ± 1.2 ^b	53.3 ± 2.0 ^{a,b,c}	47.8 ± 1.4 ^c	0.002*
PPD (mm)	2.05 ± 0.06 ^{a,b}	3.06 ± 0.13 ^{a,c}	2.11 ± 0.03 ^{c,d}	2.83 ± 0.17 ^{b,d}	<0.000*
PPD≤3 (sites)	158.3 ± 4.1 ^{a,b}	103.6 ± 5.5 ^{a,c}	140.4 ± 5.9 ^{c,d}	95.1 ± 6.2 ^{b,d}	<0.000*
PPD4-6 (sites)	0 ^{a,b}	32.9 ± 4.2 ^{a,c}	0 ^{c,d}	28.5 ± 3.4 ^{b,d}	<0.000*
PPD≥7 (sites)	0 ^{a,b}	4.7 ± 1,1 ^{a,c}	0 ^{c,d}	5.5 ± 2.2 ^{b,d}	<0.000*
CAL (mm)	2.09 ± 0.06 ^{a,b}	3.82 ± 0.22 ^{a,c}	2.21 ± 0.03 ^{c,d}	3.81 ± 0.25 ^{b,d}	<0.000*
n. teeth	26.4 ± 0.7 ^a	23.7 ± 0.5	23.4 ± 1.0	21.5 ± 0.9 ^a	<0.000*
BOP (%)	0.1 ± 0.1 ^{a,b}	19.0 ± 4.2 ^{a,c}	1.2 ± 0.4 ^c	15.0 ± 5.4 ^b	<0.000*
SUP (%)	0	1 ± 0.0	0	0.3 ± 0.2	0.078

Values are shown as mean ± standard error.

**p* are statistically significant for Kruskal-Wallis One Way Analysis.

For the Mann-Whitney test, levels connected by same letter are significantly different.

Table 2. Correlations between the HbA1c levels and clinical parameters in DM and PD+DM groups

Clinical Parameters	HbA1c	
	r	p
PPD	0.31	0.049*
PPD \leq 3	-0.39	0.013*
PPD 4-6	0.24	NS
PPD \geq 7	0.28	NS
CAL	0.36	0.022*
SUP	0.25	NS
BOP	0.10	NS
n. teeth	-0.40	0.011*

*p is significant for Spearman Nonparametric Correlation ($p < 0.05$).

NS: no significant differences for Spearman Nonparametric Correlation.

Table 3. Correlations between the HbA1c levels and salivary proteins in DM and PD+DM groups

Salivary Proteins	HbA1c	
	<i>r</i>	<i>p</i>
IL-6	0.54	<0.000*
MMP-8	0.22	NS
OPG	-0.13	NS

**p* is significant for Spearman Nonparametric Correlation ($p < 0.05$).

NS: no significant differences for Spearman Nonparametric Correlation.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Comparison of Interleukin-6 (IL-6) concentrations (pg/ml) in saliva determined by ELISA; Kruskal-Wallis One Way Analysis, $p=0.006$. (B) Comparison of Metalloproteinase-8 (MMP-8) concentrations (ng/ml) in saliva determined by ELISA; Kruskal-Wallis One Way Analysis, $p=0.004$. (C) Comparison of Osteoprotegerin (OPG) concentrations (pg/ml) in saliva determined by ELISA; Kruskal-Wallis One Way Analysis, $p=0.032$.

* For the Mann-Whitney test, groups connected are significantly different ($p<0.05$).

Figure 2. Kruskal-Wallis One Way Analysis, $p=0.042$.

* For the Mann-Whitney test, groups connected are significantly different ($p<0.05$).

FIGURES

Figure 1. Salivary proteins concentrations determined by ELISA in the groups

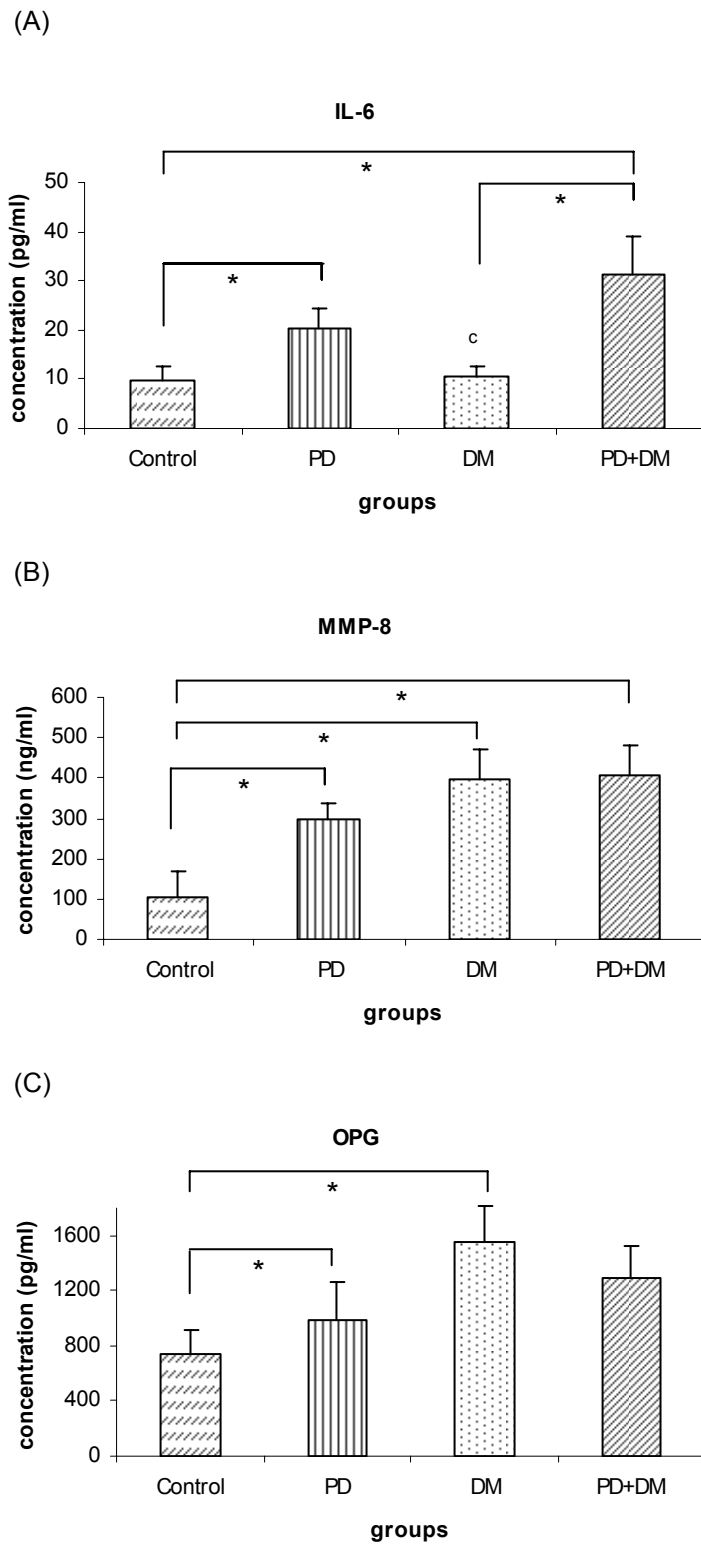
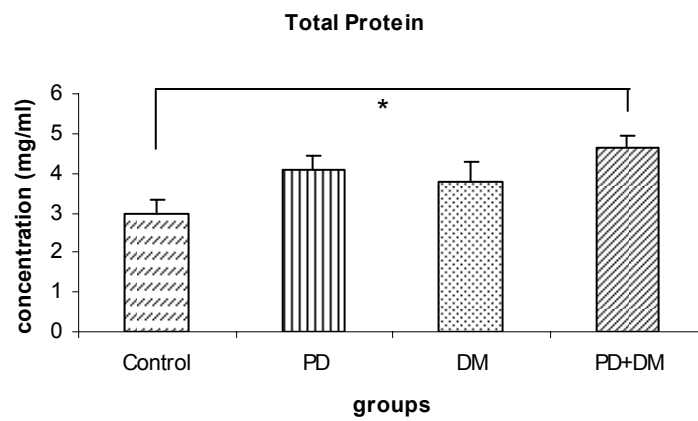


Figure 2. Salivary Total Protein concentrations (mg/ml) determined by ELISA in the groups



ANEXOS

ANEXO A. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
 14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
 Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/032/FORP/28022007

Prezado(a) Professor(a),

Ref.: Processo nº 2007.1.104.58.0
Caae n. 0010.0.138.000-07

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 75ª Sessão realizada no dia 28 de fevereiro de 2007, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Análise de biomarcadores na saliva como meio de diagnóstico e avaliação de risco"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, esclarecemos que o **Relatório Parcial** deverá ser encaminhado à Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa até o dia **28 de fevereiro de 2008** e o **Relatório Final** até o dia **28 de fevereiro de 2009**, conforme modelo que se encontra no *site* da FORP/USP (*link*: Colegiados e Comissões - Comitê de Ética em Pesquisa - Formulários do Pesquisador para entrega dos Relatórios Parcial ou Final).

Atenciosamente,

Luci Rose Nassif Merjezes

Secretária "ad-hoc" do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. MÁRIO TABA JUNIOR

Professor Associado do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia - FORP/USP

ANEXO B. Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Termo de consentimento

Eu, _____
 _____ RG _____, CPF _____, fui convidado a participar da pesquisa “Análise de biomarcadores na saliva como meio de diagnóstico e avaliação do risco sistêmico”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mário Taba Júnior e da mestranda Priscila Paganini Costa e afirmo que todas as implicações abaixo relacionadas me foram devidamente esclarecidas, inclusive verbalmente, através de questões levantadas junto aos pesquisadores, não restando qualquer dúvida que possa sugerir que tal consentimento não tenha sido feito de livre e espontânea vontade. Estou ainda ciente de que:

- 1) O objetivo desta pesquisa é realizar uma avaliação clínica de dados periodontais e análise da saliva em pacientes portadores de periodontite crônica (um tipo de doença que destrói rapidamente o osso em volta dos dentes) e/ ou com doença do coração e diabetes.
- 2) O paciente será submetido a um exame clínico computadorizado para a obtenção dos dados clínicos e coleta de saliva.
- 3) O paciente receberá o tratamento periodontal básico composto por raspagem do tártaro e placa em uma única sessão.
- 4) Os procedimentos que poderão causar desconforto para o paciente são os do exame clínico e coleta da saliva.
- 5) Sei que tenho liberdade de me recusar a participar ou de me retirar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma represália ou negligência em meu tratamento.
- 6) Sei também que todos os dados que forem relatados ao pesquisador em confiança serão mantidos sigilosos, garantindo minha privacidade.
- 7) Tenho consciência de que qualquer dano à minha saúde que seja decorrente da minha participação nesta pesquisa será reparado sem que eu necessite fazer qualquer despesa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200____.

 Paciente ou responsável

 Prof. Dr. Mario Taba Júnior

 Mestranda Priscila Paganini Costa (8114.2620)

ANEXO C. Carta de Submissão do artigo ao Journal of Periodontology

LETTER OF SUBMISSION

DATE: April 28, 2008

MANUSCRIPT TITLE: Salivary Biomarkers of Periodontal Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

MANUSCRIPT NUMBER (IF KNOWN): _____

STATEMENT:

We, the undersigned authors, agree that the above-referenced manuscript is original, has not been published elsewhere, and is being submitted solely to the *Journal of Periodontology*. (Please feel free to add additional lines as needed.)

Author Signature

Priscila Paganini Costa
 Mario Taba Jr.
 Glauce Trevisan
 Viviane Keiko dos Santos Kawata
 Guilherme de Oliveira Macedo
 Arthur B. Novaes Jr.
 Sergio Luis Scobatti de Souza
 Marcio Fernando de Moraes Grisi
 Daniela Bazan Palioto


Printed Name


Priscila Paganini Costa
 Mario Taba Jr
 Glauce Lunardelli Trevisan
 Viviane Keiko dos Santos Kawata
 Guilherme de Oliveira Macedo
 Arthur Belém Novaes Jr
 Sergio Luis Scobatti de Souza
 Marcio Fernando de Moraes Grisi
 Daniela Bazan Palioto

ANEXO D. Confirmação de submissão

Manuscript Central

<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>


[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)



[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Priscila Costa

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Periodontology*.

Manuscript ID: JOP-08-0234

Title: Salivary Biomarkers in Periodontal Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Costa, Priscila
 Taba, Mario
 Trevisan, Glauce
 Kawata, Viviane

Authors: Macedo, Guilherme
 Novaes Jr, Arthur
 Souza, Sergio
 Grisi, Marcio
 Palioto, Daniela B.

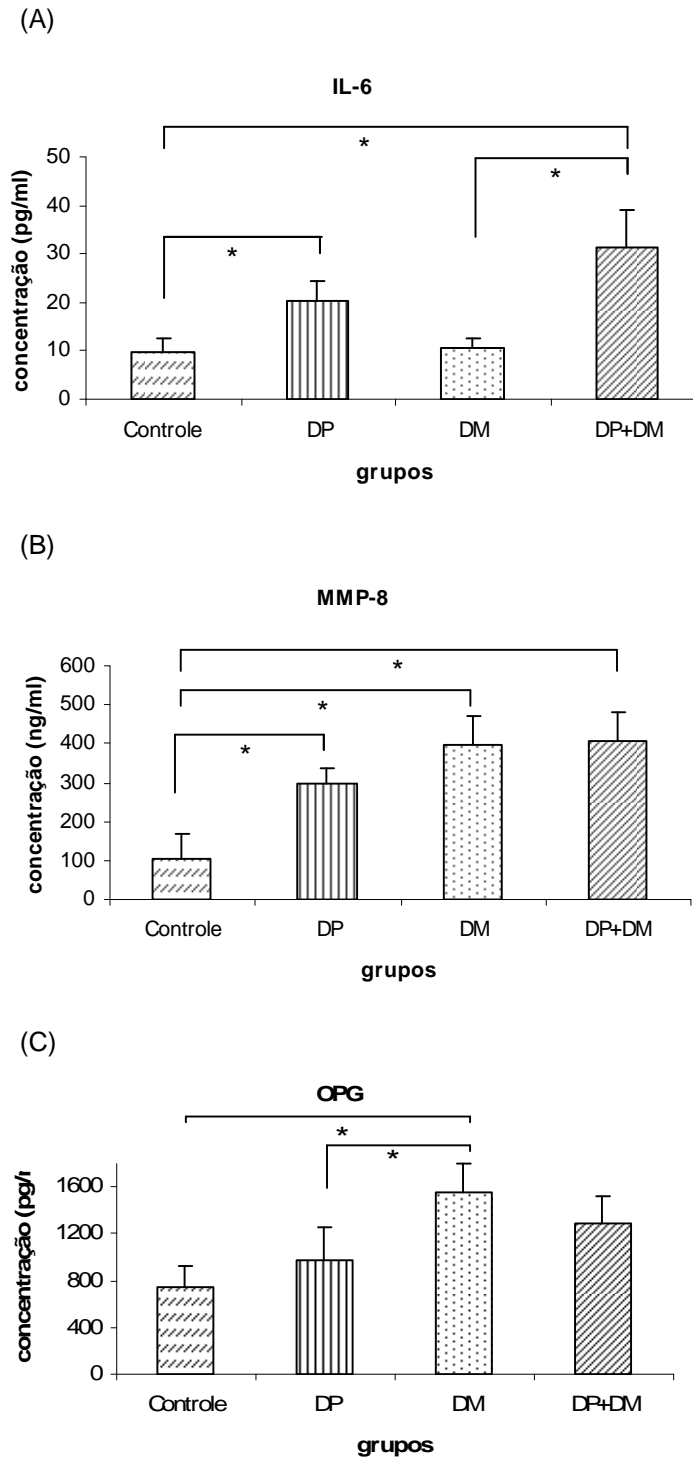
Date Submitted: 28-Apr-2008

 Print
  Return to Dashboard

Manuscript Central™ v4.10 (patent # 7,257,767 and # 7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2007. All Rights Reserved.
 Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)

ERRATA

Gráfico 1. Concentrações das proteínas salivares dos grupos determinadas pelo ELISA



(A) Comparação da concentração (pg/ml) de Interleucina-6 (IL-6) na saliva determinada pelo ELISA; para análise Kruskal-Wallis One Way, $p=0,006$. (B) Comparação da concentração (ng/ml) de Metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8) na saliva determinada pelo ELISA; análise Kruskal-Wallis One Way, $p=0,004$. (C) Comparação da concentração (pg/ml) de Osteoprotegerina (OPG) na saliva determinada pelo ELISA; análise Kruskal-Wallis One Way, $p=0,032$.

* Para o teste Mann-Whitney, grupos conectados são significativamente diferentes ($p<0,05$).