



**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas**

Evelyn Mikaela Kogawa

**Concentração e perfil genético da Cromogranina A e a sua
correlação com os aspectos salivar, dental e status periodontal –
Um estudo transversal em portadores de Diabetes Mellitus tipo 2**

**Brasília
2015**



**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas**

Evelyn Mikaela Kogawa

**Concentração e perfil genético da Cromogranina A e a sua
correlação com os aspectos salivar, dental e status periodontal –
Um estudo transversal em portadores de Diabetes Mellitus tipo 2**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista de Amorim

Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Pinheiro Falcão da Rocha

**Brasília
2015**

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, que divinamente propõe desafios na minha vida, me ensinando a cada dia a ser uma pessoa melhor, estando sempre ao meu lado e colocando pessoas especiais no meu caminho a quem posso todos os dias exercer o amor e o perdão.

Aos meus queridos pais, Eduardo e Margaret, que com uma missão tão árdua, conseguiram me guiar com excelentes valores, sempre me incentivando e não me deixando sequer desistir dos meus sonhos. Não tenho palavras por tudo que já fizeram por mim e por mais que eu tente recompensá-los todos os anos de desprendimento, resignação, devoção e amor eu jamais conseguiria, mas tentarei até os últimos dias de minha vida... Muito obrigada, sinto muito orgulho de tê-los como meus pais...

Aos meus irmãos, Marjory e Maikol, meus companheiros de vida que sempre estiveram ao meu lado entendendo só o que os irmãos compreendem. Muito obrigada pelo carinho e pelo apoio de sempre. Aproveito e externo minha dedicatória ao mais novo integrante da família, meu lindo afilhado Lorenzo. Agradeço também ao Fábio e a Karina pelo convívio e os momentos sempre compartilhados!

Ao Guilherme, é difícil descrever em palavras o tanto que você deu paz em minha vida, o quanto você me ajudou a desacelerar o meu ritmo para que eu possa curtir mais o dia-a-dia, a tentar exercer o melhor de mim, a tentar buscar em mim o que nem imaginava poder fazer. Dedico esse trabalho a você porque pacientemente, afagou as minhas lágrimas, vibrou comigo, revisou minha tese e me incentivou quando eu pensei que não conseguiria. Muito obrigada do fundo do coração, sem você ao meu lado durante esse tempo, tudo seria ainda mais difícil!

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos colaboradores desse trabalho, em especial:

Ao Prof. Rivadávio, pela orientação desse trabalho, que apesar de tantas incertezas no meio do caminho acreditou em mim na concretização desse doutorado. Muito obrigada Riva pela amizade, e apesar de tantos desafios no meio do caminho, percebo sua garra em estar sempre se aprimorando.

À Profa. Izabel Cristina Silva, que no meio da sua gravidez e tantos afazeres e problemas, passou muitos dias comigo tentando terminar minha infinita estatística, que pacientemente revisava todas as minhas questões e por todas as madrugadas perdidas por minha causa. Muito obrigada profa.!

A Profa. Daniela Correa Grisi, que planejou comigo esse doutorado desde que começamos com nosso projeto de extensão, pessoa amiga, companheira, preocupada, inspiradora e ao mesmo tempo sempre tentando elevar o nível científico de tudo que fizemos. Obrigada amiga!

A minha companheira, braço direito e esquerdo Ingrid Amorim, começou comigo como minha aluna de IC, e vivenciou todas as etapas da pesquisa, acordando de madrugada e me ajudando com tantos pacientes. Sem você essa pesquisa não teria saído, trabalhar com você foi muito prazeroso, me orgulho de vê-la agora no mestrado, estarei sempre torcendo e te incentivando no seu sucesso. Você merece!!! Muito obrigada Ingrid, você foi demais!

Ao Prof. Osmar Nascimento da Silva pela paciência em me ensinar, pela amizade, pela imensa ajuda nos testes proteômicos, por simplesmente ouvir minhas angústias e por sempre tentar acrescentar algo inovador ao meu trabalho.

A Profa. Denise Falcão, pela co-orientação desse trabalho, pela ajuda em vários momentos, desde o início do projeto de pesquisa, com os artigos, com minha qualificação, com a estatística e pelo apoio de sempre. Muito obrigada!

Ao Prof. Octavio Franco, pela imensa contribuição ao trabalho, que no meio de mil afazeres, arranjava um tempo rápido de me ajudar com minhas publicações.

A Profa. Taíá Rezende, que sempre ouviu minhas lamúrias da pesquisa, sempre disposta a me ajudar, pelas imensas contribuições no meu trabalho, pela amizade e pelo seu caráter que me faz querer estar sempre ao seu lado.

A Isabel Cristina Marques Fensterseifer, Larissa Bittencourt, Selma Soares Nascimento, Diego Batista da Silva, Poliana Amanda Oliveira Silva e vários alunos da UCB que me ajudaram com os experimentos e com a seleção dos pacientes.

Aos queridos, Sérgio, Lícia, Vanessa, Marília, Vó Maria e Eurione, por sempre me acolheram com um sorriso

no rosto, por estarem presentes, me apoiando e me desejando pensamentos positivos, principalmente para a finalização desse trabalho.

Aos meus amigos de pós-graduação em especial Eduardo Rosa e Giovanni Modesto que me incentivaram, que nos lamentávamos, que dividíamos juntos o longo caminho de 4 anos até ver a luz no túnel. Obrigada amigos, as nossas risadas e companheirismo fortaleceram todo o trabalho!

A Profa. Maria do Carmo, incentivadora desde a minha graduação, pela amizade, pela conduta de professora a qual sempre me espelhei, muito obrigada por sempre ter uma palavra oportuna para falar quando mais precisei, e por acreditar em mim quando nem eu imaginava que eu era capaz.

A Universidade de Brasília, que tornou possível a concretização desse sonho, aproveito e agradeço os grandes mestres em especial, Prof. Leopoldo e Profa. Lícia pelas contribuições no meu projeto, pelos conselhos e aos funcionários da pós-graduação representado pelo tão prestativo Alessandro.

A Universidade Católica de Brasília, considero minha segunda casa, que me acolheu e me proporcionou subsídios para finalização desse projeto. Ao curso de odontologia, representada pelo diretor Prof. Eric Jacomino Franco e pelo pró-reitor de graduação Prof. Daniel Rey de Carvalho, mais do que meus chefes, meus amigos, e pessoas que sempre torceram pelo meu melhor no meio acadêmico. Muito obrigada!

Aos meus queridos amigos e professores da Universidade Católica de Brasília, um grupo muito seletivo de professores que se uniram para serem amigos também, uma honra e um prazer trabalhar com todos vocês, em especial Profa. Luciana, Profa. Anne, Prof. Rodrigo, Profa. Raquel, Profa. Andrea, Prof. Thiago e Prof. Marcos.

Aos meus companheiros e funcionárias da Clínica Pío XII, em especial Prof. Gustavo Rivera, Prof. An Tien, Prof. Paulo Yamaguti, Dr. Haroldo, que desde que cheguei em Brasília me acolheram como amigos e acreditaram no meu profissionalismo.

Aos meus amigos queridos que fazem minha vida mais alegre, em especial Máira, Eduardo Simioli, Alíne, Thania, Luciane, Marina, Leda, Cristiano, Camila, Rodrigo, Bruno e Paulinho.

E a todos amigos queridos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho. Muito obrigada!

*Há um tempo em que é preciso
abandonar as roupas usadas,
que já tem a forma do nosso corpo,
e esquecer os nossos caminhos,
que nos levam sempre aos mesmos lugares.*

*É o tempo da travessia: e,
se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre,
à margem de nós mesmos.*

-Fernando Pessoa-

RESUMO

Introdução e objetivos: O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas que frequentemente conduz a um comprometimento de saúde geral, incluindo alterações bucais. A Cromogranina A (CgA) é uma glicoproteína ácida e tem sido considerada um biomarcador da atividade simpática neural. Sua concentração pode estar associada tanto a alterações relacionadas ao DM quanto a algumas manifestações bucais da doença. O presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito do DM2 nas funções salivares e nos indicadores clínicos de saúde bucal de acordo com o controle glicêmico dos pacientes e comparar a concentração e o perfil genético da CgA entre indivíduos não-diabéticos e pacientes com DM2.

Método: Neste estudo transversal, 110 indivíduos de ambos os sexos foram divididos em três grupos: 36 pacientes com DM2 compensados, 36 com DM2 descompensados e 38 indivíduos não-diabéticos (grupo controle). Foram avaliados a condição periodontal (profundidade de sondagem, índice de sangramento e perda de inserção clínica), índice de placa bacteriana, status de cárie dentária (índice CPOD), fluxos salivares e capacidade tampão. Amostras de saliva foram coletadas por meio do fluxo salivar total em repouso (STR), fluxo salivar total estimulado (STE) e fluxo salivar não estimulado da mucosa labial superior (SLS). As concentrações de CgA foram determinadas na saliva e no plasma com kits de ELISA, e dois polimorfismos de fragmentos de restrição da CgA (T-415C e Glu264Asp) foram analisados por reação em cadeia da polimerase. Os resultados foram analisados por meio do teste de Shapiro-Wilk, ANOVA a 1 critério com pós teste de Tukey, Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, testes t de Student, U de Mann-Whitney, qui-quadrado e coeficiente de correlação de Pearson ($p < 0,05$).

Resultados: Os níveis de CgA plasmática e salivar foram maiores nos grupos DM2 ($p = 0,019$ e $p < 0,001$, respectivamente). Pacientes com DM2 apresentaram menores taxas de fluxos SLS e STR, independentemente do controle glicêmico, em comparação ao grupo controle ($p = 0,002$ e $p = 0,027$, respectivamente). O grupo DM2 descompensados apresentou menores valores de STE ($p = 0,026$) e maiores valores de capacidade tampão da saliva, índice de placa visível e sangramento à sondagem do que outros grupos ($p < 0,05$). Nenhuma diferença foi encontrada para o índice CPOD (dentes cariados, perdidos e obturados) entre os grupos. Sítios com perda de inserção clínica (PIC) de 4 e 5-6 mm foram mais elevados em ambos os grupos diabéticos, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). O grupo DM2 descompensados apresentou sítios mais elevados de PIC ≥ 7 mm do que os outros grupos ($p = 0,001$). Em ambos os grupos diabéticos, a profundidade de sondagem de 5-6 mm e a PIC 5-6 mm foram associadas a uma maior concentração de CgA salivar ($p < 0,05$). Variantes genéticas da CgA (T-415C e Glu264Asp) revelaram diferenças entre diabéticos e controle quando associadas com menores taxas de fluxos salivares e com maior produção de CgA salivar ($p < 0,05$).

Conclusões: Os resultados indicam que maiores níveis de CgA plasmática e salivar são associados com os pacientes DM2. Os achados revelam que pacientes DM2 são mais suscetíveis a anormalidades na função das glândulas salivares e aos danos nos tecidos periodontais do que ao risco de cárie. Além disso, a taxa de fluxo STE e o grau de perda de inserção clínica deterioraram significativamente com o pobre controle glicêmico de indivíduos com DM2. A elevada concentração

de CgA salivar foi associada com condições periodontais piores e com o diabetes, e poderia estar relacionada com a patogênese de ambas as doenças. Este foi o primeiro estudo a verificar que polimorfismos da CgA podem estar associados com a hipofunção das glândulas salivares e com a maior produção de CgA nos pacientes DM2, e isso pode ser um indicador significativo para se estabelecer o papel da CgA salivar como um potencial biomarcador clínico para o DM2.

Descritores: Diabetes *Mellitus* tipo 2, cromogranina A, periodontite, estresse, saliva, saúde bucal.

ABSTRACT

Background and objectives: Diabetes Mellitus (DM) is a group of metabolic diseases that often leads to a general health compromise, including oral health. The Chromogranin A (CHGA) is an acid glycoprotein and has been considered a biomarker of neural sympathetic activity. Its concentration can be associated with both changes related to DM and some oral manifestations of the disease. This study aimed to evaluate the effect of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) on salivary function impairments and clinical oral health indicators according to glycemic control status and to compare the concentration of CHGA with its genetic profile among nondiabetic subjects and T2DM patients.

Method: In this cross-sectional study, 110 individuals of both genders were divided into three groups: 36 patients with controlled T2DM, 36 with poorly-controlled T2DM and 38 nondiabetic subjects (control group). Periodontal status (probing depth, bleeding on probing and clinical attachment loss), plaque index, dental caries status (DMFT index), salivary flow rate and buffering capacity were assessed. Saliva samples were collected by means of unstimulated whole (UWS), stimulated whole (SWS) and unstimulated labial (ULS) salivary flow rates. CHGA concentrations were determined in saliva and plasma with ELISA kits, and two CHGA polymorphisms (T-415C and Glu264Asp) were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. The results were analyzed using Shapiro-Wilk test, ANOVA with post test 1 Tukey Test, Kruskal-Wallis with Dunn's post test, Student t test, Mann-Whitney test, chi-square and Pearson's correlation coefficient ($p < 0.05$).

Results: Higher plasma and salivary CHGA levels were found in T2DM groups ($P=0.019$ and $P<0.001$, respectively). T2DM patients presented lower ULS and UWS flow rates regardless of glycemic control status compared to controls ($P=0.002$ and $P=0.027$, respectively). Poorly controlled T2DM group exhibited lower values of SWS ($P=0.026$) and higher mean buffering capacity, plaque index and bleeding on probing than other groups ($P<0.05$). No difference was found to DMFT (decayed, missed and filled teeth) index between groups. Sites with clinical attachment loss (CAL) 4 and 5 to 6 mm were higher in both diabetic groups compared to control group ($P<0.05$). Poorly controlled T2DM group had significantly higher sites with $CAL \geq 7$ mm than other groups ($P=0.001$). In both diabetic groups, probing depths 5 to 6 mm and CAL 5 to 6 mm were associated with higher salivary CHGA concentration ($P<0.05$). CHGA gene variants (T-415C and Glu264Asp) revealed significant differences between diabetics and control subjects when associated with lower salivary flow and higher salivary CHGA production ($P<0.05$).

Conclusions: Our findings also indicate an association between plasma and salivary CHGA levels and T2DM patients. The findings revealed that T2DM were more prone to periodontal tissue damage than to caries risk. T2DM causes abnormalities in the function of salivary glands; however, poorly-controlled T2DM has the most influence on SWS flow rates. The results also provide some evidence that the degree of attachment loss deteriorates significantly with poor glycemic control in T2DM ($CAL \geq 7$ mm). Moreover, the results suggest that high concentration of salivary CHGA are associated with worse periodontal parameters and T2DM, and this could be related to the pathogenesis of both diseases. This was the first study to verify that the CHGA polymorphisms might be associated with salivary gland hypofunction and higher salivary CHGA production in T2DM

patients, and this could be a significant insight to establish a role for salivary CHGA as a potential clinical biomarker to T2DM.

Keywords: Type 2 Diabetes *Mellitus*, chromogranin A, periodontitis, stress, saliva, oral health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Os possíveis mecanismos que ligam a inflamação periodontal e o diabetes. As citocinas alteradas em condições de diabetes são marcadas em vermelho. ↑, aumentado em comparação com condições sistemicamente saudáveis; ↓, diminuído em comparação com condições sistemicamente saudáveis (IFN- γ , o interferon-gama; IL-1RA, antagonista do receptor de interleucina 1; LPS, lipopolissacarídeo; MCP-1, proteína quimioatrativa de monócitos 1; MIP-1 α , proteína inflamatória de macrófago 1alfa; MO, macrófagos; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; RANTES, regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais)

Figura 2 - Esquema das regiões exônicas da CgA e seus peptídeos derivados. O gene da CgA humana está organizado em oito éxons e sete íntrons. As clivagens proteolíticas das sequências específicas da CgA pelas convertases pro-hormônio geram vários péptidos bioativos. Algarismos romanos indicam as sequências de éxons do RNAm, ao passo que os números arábicos identificam os aminoácidos da proteína madura e do peptídeo sinal.

Figura 3 - Tiras de teste de *Schirmer* (Ophthalmos Indústria, São Paulo, SP, Brasil).

Figura 4 - Tira de *Schirmer* colocada em um copo descartável (A) e pesada previamente a coleta salivar em uma balança analítica digital (B). Em seguida, tarou-se a balança (C).

Figura 5 - Roletes de algodão colocados bilateralmente na região dos ductos de *Stenon* das glândulas parótidas, na altura dos segundos molares superiores.

Figura 6 - Posicionamento da tira de *Schirmer* para avaliação salivar das glândulas salivares menores do lábio superior (A). Recobrimento da tira com o lábio (B).

Figura 7 - Tira de *Schirmer* pesada após a avaliação salivar.

Figura 8 - Coletor universal descartável e esterilizado (A). Coletor universal previamente pesado (B). Após a pesagem, tarou-se a balança (C).

Figura 9 - Escoamento passivo da saliva em repouso durante 5 minutos.

Figura 10 - O coletor foi pesado novamente após a coleta salivar e o fluxo salivar em repouso foi determinado.

Figura 11 - Coletor universal descartável e esterilizado (A). Coletor universal previamente pesado (B). Após a pesagem, tarou-se a balança (C).

Figura 12 - Dispositivo estéril de silicone de 1 cm de comprimento envolto por um fio dental (A). Ilustração do paciente utilizando o dispositivo (B).

Figura 13 - O paciente foi instruído a mastigar o dispositivo por 5 minutos, sem soltar o fio dental. Durante o período da coleta, foi recomendado que o paciente não engolissem a saliva que se formava, e que a depositasse no coletor universal esterilizado sempre quando desejasse.

Figura 14 - Nova pesagem do coletor após coleta e determinação do fluxo salivar estimulado.

Figura 15 - Fita indicadora com diferentes escalas de cor (PH FIX test strips, MACHERY-NAGEL, Düren, Germany).

Figure 16 - Concentração da Cromogranina A salivar (pmol/mL) nos diferentes grupos estudados (teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de comparação múltipla de *Dunn*, $P < 0,001$).

Figure 17 - Concentração da Cromogranina A plasmática (pmol/mL) nos diferentes grupos estudados (teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de comparação múltipla de *Dunn*, $P=0,019$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características sociodemográficas e parâmetros clínicos gerais da amostra.

Tabela 2- Características da história da doença Diabetes Mellitus, exames laboratoriais e complicações concomitantes.

Tabela 3- Quantidade de medicamentos e proporção de categorias de medicamentos utilizados por cada grupo estudado.

Tabela 4- Proporção de categorias de medicamentos utilizados por cada grupo estudado divididos de acordo com grupo principal e subgrupos da classificação ATC.

Tabela 5- Principais sintomas orais associados com alterações do funcionamento de glândulas salivares.

Tabela 6- Principais sintomas oculares associados com alterações do funcionamento de glândulas lacrimais.

Tabela 7- Principais sintomas de alterações de pele (xerodermia).

Tabela 8- Principais sintomas de neuropatias distais.

Tabela 9 – Sintomas de secura bucal subjetivos analisados por escala analógica visual (EAV).

Tabela 10- Características e parâmetros clínicos intrabucais da amostra.

Tabela 11- Taxas dos fluxos salivares e capacidade tampão da saliva.

Tabela 12- Taxas dos fluxos salivares STR, STE e SLS associados com o número de medicamentos utilizados pelos participantes. As taxas de fluxos (ml/min) são demonstradas em valores de médias e desvio padrão (mediana).

Tabela 13- Comparação entre as concentrações de CgA (saliva e plasma) e produção de CgA salivar entre os grupos.

Tabela 14- Comparação entre os fluxos salivares, idade, número de medicamentos e concentração da CgA salivar (pmol/mL) de acordo com a presença de xerostomia.

Tabela 15- Comparação das concentrações de CgA salivar e plasmática de acordo com o PS e PIC entre os grupos.

Tabela 16- Distribuição dos genótipos e frequência dos alelos dos polimorfismos da CgA (T-415C e Glu264Asp) entre os grupos.

Tabela 17- Comparação entre os polimorfismos da CgA e a concentração da CgA salivar e plasmática (pmol/mL).

Tabela 18- Comparação entre os polimorfismos da CgA e os fluxos salivares (STR, STE e SLS).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Diabetes Association
AGE	Produtos finais da glicação avançada
ATC	Anatomical Therapeutic Clinical
bpm	Batimentos por minuto
CgA	Cromogranina A
CPOD	Índice do total de número de dentes cariados, perdidos, ou obturados
CRP	Proteína C Reativa
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DM1	DM tipo 1
DM2	DM tipo 2
FCE	Fator de Crescimento Epidérmico
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
GJ	Glicemia em jejum
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HbA1C	Hemoglobina glicada
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IL-1RA	Antagonista do receptor de interleucina 1
IMC	Índice de Massa Corpórea
irpm	Incursões por minuto
IPV	Índice de Placa Visível
ISS	Índice de Sangramento à Sondagem
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófago 1alfa
MMP	Metaloproteinases
MO	Macrófagos
OPG	Osteoprotegerina
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIC	Perda de Inserção Clínica
PMN	Polimorfonucleares
PS	Profundidade de Sondagem
PST	Pancreastatina
RAGE	Receptores de produtos finais da glicação avançada
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCH-	Íon Tiocianato
SLS	Fluxo salivar não estimulada da mucosa labial superior
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo simples
SPS	Sistema Peroxidase Salivar
STE	Fluxo salivar total estimulada
STR	Fluxo salivar total em repouso
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-β	Fator de necrose tumoral beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3. OBJETIVOS.....	33
4. PACIENTES E MÉTODO.....	35
5. RESULTADOS	48
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONCLUSÕES.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
9. ARTIGOS PUBLICADOS E ENVIADOS.....	94
ANEXOS.....	140
APÊNDICES.....	143

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma desordem metabólica heterogênea de etiologia múltipla, caracterizada pela hiperglicemia crônica com anormalidades no metabolismo de glicose, carboidratos, lipídeos e proteínas (1). Os principais tipos de diabetes diferenciam-se pela etiologia e pelos padrões de distribuição. O DM tipo 1 (DM1) é resultado da falha primária das células beta pancreáticas ao produzir o hormônio insulina, enquanto o DM tipo 2 (DM2) é causado pela falha no mecanismo de sinalização da insulina nas células-alvo do corpo, que se tornam incapazes de utilizar a insulina circulante.

Estados frequentes de hiperglicemia crônica podem levar a várias alterações sistêmicas, dependendo do nível de controle metabólico do paciente. As consequências do DM em longo prazo incluem complicações de ordem neurológica, articular, microvascular, macrovascular, dentre outras (2, 3), as quais levam ao desenvolvimento de nefropatia, retinopatia, neuropatia, disfunção do sistema nervoso autônomo, disfunção sexual (4-8), além do risco de desenvolvimento de problemas cardiovasculares (9-11).

Numerosos estudos clínicos relataram maior incidência e gravidade de moléstias bucais em pacientes com pobre controle do DM em comparação com grupo controle sem diabetes. Dentre estas estão: perdas dentárias, doenças periodontais, abscessos odontogênicos, sangramento gengival espontâneo, eritema, parestesia, ardor bucal, dormência da membrana da mucosa oral, glossite romboide mediana, língua fissurada e geográfica, lesões de cárie, maior acúmulo de placa bacteriana, candidose oral e aumento da incidência de outras infecções. Observa-se também que o portador fica vulnerável à lentidão da cura, disgeusias, halitose, ocorrência de líquen plano e reações liquenóides (12-18).

Após estudo de Løe em 1993 (19), a doença periodontal passou a ser considerada a sexta complicação clássica mais comum do diabetes. A relação bidirecional entre a doença periodontal e o DM é relatada com grande enfoque na literatura, pois o diabetes favorece o desenvolvimento da doença periodontal e esta, quando não tratada, piora o controle metabólico do diabetes; ou seja, alterações metabólicas nos tecidos periodontais podem diminuir a resistência dos diabéticos às infecções e também influenciar o início, o desenvolvimento e a progressão da doença periodontal inflamatória (20-27). Por sua vez, infecções sistêmicas e locais (ex. infecção periodontal) exacerbam a resposta do hospedeiro, contribuindo para a aceleração do desenvolvimento da resistência à insulina e, conseqüentemente, o aparecimento do DM2 e suas complicações. Alguns estudos já demonstram o efeito favorável da terapia periodontal no controle metabólico de pacientes diabéticos pobremente controlados (28-36).

Embora a doença periodontal seja considerada a maior complicação bucal do diabetes, existem outras manifestações que podem influenciar e impactar na saúde bucal e, possivelmente, na saúde sistêmica do indivíduo doente. Um adequado funcionamento das glândulas salivares é de grande importância para a manutenção da saúde da mucosa bucal e dos dentes, e qualquer alteração tanto na quantidade como na qualidade da saliva pode alterar a homeostasia da cavidade bucal e o processo de reparação. O DM é provavelmente a doença metabólica crônica que mais afeta

o funcionamento salivar (37), e isso se deve a complicações de neuropatia autonômica e doenças microvasculares, características das própria doença (38, 39).

As alterações salivares mais comumente encontradas nos diabéticos são: hipossalivação, xerostomia e alteração da sua composição, relacionadas principalmente à elevação dos níveis de glicose, potássio, cálcio, magnésio, proteínas, alfa-amilase, IgA, IgG e à maior atividade da peroxidase. Tais alterações são decorrentes dos quadros de desidratação, sede frequente e inadequado controle glicêmico do paciente (15, 37, 38, 40, 41). Alterações estruturais no parênquima glandular também são observadas em portadores de DM, como atrofia acinar e infiltração adiposa (42).

A saliva tem se tornado um importante método de diagnóstico futuro para várias doenças, com a vantagem de não ser invasivo, além de ser rápido, indolor e ter ótimo custo-benefício. Vários estudos na literatura apontam a presença de vários biomarcadores encontrados na saliva, e alguns têm documentado o valor clínico da mensuração da Cromogranina A (CgA) como um marcador para doenças associadas a células neuroendócrinas, doenças vasculares, diabetes e outras (43-45).

A CgA é uma glicoproteína secretora fosforilada ácida pertencente à família Granina, encontrada em vários tipos de tecidos neuroendócrinos. Ela é armazenada junto a outros tipos de neurotransmissores e hormônios peptídicos em vesículas secretoras. A CgA é co-secretada, juntamente com as catecolaminas da medula supra-renal, pelas terminações nervosas simpáticas e pelas glândulas salivares submandibulares (46), e tem se mostrado útil como marcador biológico da atividade nervosa simpática (47). A CgA, quando intracelular, tem um papel importante na regulação da formação e liberação de vesículas secretoras, estando associada ao complexo de golgi e, quando extracelular, é um polipeptídeo pró-hormonal, que sofre clivagem, dando origem a peptídeos biologicamente ativos como: pancreastatina (PST) (48, 49), vasostatina I e II, (50) e catestatina (51). A PST diabetogênica (CgA humana₂₅₀₋₃₀₁) tem como ações inibir a liberação de insulina estimulada pela glicose das células β das ilhotas pancreáticas (49) e também inibir a recaptura de glicose pelos adipócitos e hepatócitos (48). Dessa forma, a PST age no metabolismo da glicose e de ácidos graxos livres, e o aumento de PST no plasma de indivíduos diabéticos correlaciona-se com a resistência à insulina (52).

Alguns estudos têm reportado níveis elevados de CgA salivar associados a indivíduos sistemicamente saudáveis com sintomas de hipossalivação e xerostomia (53), indivíduos com periodontite (54-56), e pacientes diabéticos tipo 2 (45). Como visto, a CgA está relacionada a algumas complicações bucais que o DM pode acarretar e também ao próprio DM2; porém não há relatos na literatura que relacionem essas manifestações bucais com a CgA em indivíduos portadores de DM2. Uma melhor compreensão da expressão dessa proteína poderá apontar novos caminhos para a busca de novos biomarcadores que influenciam as manifestações bucais e a presença de DM2 na população.

2. Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nos dias atuais, o DM tem se tornado um importante problema de saúde pública, tanto em termos de número de pessoas afetadas, incapacitações e mortalidade prematura, como dos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações. A sua prevalência vem aumentando em várias populações, tendo se tornado uma das doenças crônicas mais prevalentes em todo o mundo, em decorrência das maiores taxas de urbanização, industrialização, sedentarismo, obesidade e aumento da expectativa de vida (57). De acordo com a International Diabetes Federation em 2014, estima-se que 387 milhões de pessoas sejam portadoras de DM, o que corresponde a 8,3% da população mundial adulta. Se esta tendência de crescimento se mantiver, calcula-se que 592 milhões de pessoas serão acometidas por esta doença até 2035. Por ser considerada uma doença silenciosa, estima-se que 46,3% dos portadores ainda não foram diagnosticados em todo o mundo (58).

Após anos de controvérsia, um consenso foi alcançado entre as sociedades científicas de diabetes, e classificaram o DM nas seguintes categorias gerais (59):

a) DM1 - decorrente da destruição de células β -pancreáticas, acomete mais frequentemente indivíduos menores de 30 anos, embora possa aparecer em qualquer idade. Geralmente os sintomas são mais agudos, podendo levar à cetose e à maior perda de peso, demandando a administração de insulina exógena.

b) DM2 - caracterizada pelo defeito progressivo na secreção de insulina e/ou pela resistência à insulina nos tecidos. Pacientes com DM2 geralmente apresentam resistência à insulina que altera a utilização da insulina endógena pelas células-alvo. Durante o estágio inicial da doença, a produção de insulina é aumentada, resultando numa hiperinsulinemia. Entretanto, à medida que a condição vai progredindo, a produção de insulina diminui, levando a deficiência de insulina. Geralmente seu início é silencioso ou insidioso, com histórico familiar e ausência de cetose. Embora ambas DM1 e DM2 apresentem predisposição genética, a etiologia do DM2 é também relacionada aos fatores de estilo de vida, tais como ingestão de açúcar e gordura, sedentarismo e obesidade ou sobrepeso. Os pacientes apresentam graus variados de déficit de secreção e de resistência à insulina, e são considerados um grupo heterogêneo sem nenhum marcador definido.

c) Diabetes gestacional - definida como uma alteração no metabolismo de glicose durante a gravidez, diagnosticada a partir do primeiro trimestre de gestação.

d) Tipos específicos de diabetes - incluem defeitos genéticos funcionais da célula β -pancreática ou na ação da insulina, hiperglicemia induzida por fármacos e agentes químicos, diabetes induzida por infecções, doenças do pâncreas exócrino, diabetes neonatal e formas infrequentes de origem genética ou imunológica.

O DM2, por ser a forma mais comum da doença, correspondendo entre 90 a 95% dos casos de DM, será abordado com mais enfoque nesse trabalho. Uma vez que várias complicações bucais podem ser influenciadas pela presença do DM, torna-se necessário embasar esse trabalho, apresentando os relatos e controvérsias existentes na literatura, e a problemática envolvida na abordagem dessa complexa doença.

2.1. Diabetes *Mellitus* e as complicações bucais

2.1.1. Diabetes *Mellitus* e a doença periodontal

Diabetes *Mellitus* e doença periodontal são, ambas, doenças multifatoriais com uma alta prevalência mundial. A doença periodontal (DP) tem sido considerada uma das principais razões para a perda dentária em pacientes com diabetes (60), e estima-se que ela seja a segunda principal doença bucal na população mundial (61). Muitos estudos conduzidos em adultos têm relatado uma associação bidirecional positiva entre diabetes (tanto tipo 1 quanto tipo 2) e a DP, ou seja: o diabetes aumenta o risco de desenvolver periodontite e piora a periodontite pré-existente, assim como a periodontite pode aumentar o risco de desenvolvimento ou piora no controle metabólico do diabetes (20-24, 27, 62).

As doenças periodontais (gingivite e periodontite) são processos inflamatórios crônicos causados pela presença do biofilme dentário. Tem sido relatado que a presença de certas bactérias (ex. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Tannerella forsythia*) podem ser um fator de risco para a destruição periodontal (63). Essas espécies bacterianas apresentam diferentes fatores de virulência que permitem a colonização da área subgingival e produzem fatores que induzem o hospedeiro a uma resposta imuno-inflamatória, desencadeando a destruição tecidual. Porém, as bactérias sozinhas parecem não ser suficiente para explicar o estabelecimento e a progressão da doença. Logo, apesar da sua característica infecciosa, a DP também requer uma suscetibilidade do hospedeiro para produzir uma reação inflamatória crônica responsável pelo dano periodontal (64).

A presença subgingival de bactéria induz a produção de citocinas e outros mediadores químicos pró-inflamatórios nos tecidos periodontais, gerando uma resposta inflamatória (gingivite clínica). Na gingivite, existe uma predominância de leucócitos polimorfonucleares (PMN), que liberam numerosas enzimas com efeitos deletérios nos tecidos do hospedeiro e micro-organismos. Este processo permanece sob controle até os PMN conseguirem limitar adequadamente o crescimento bacteriano (65). Caso contrário, o sistema imune adaptativo é ativado com a produção de antígenos bacterianos pelas células de Langerhans e macrófagos, e a consequente ativação dos linfócitos T e B. Os diferentes mediadores produzidos durante este processo [ex. prostaglandina E2, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), etc.] induzem a degradação do tecido conjuntivo por metaloproteinases (MMP) (especialmente MMP-8, MMP-9 e MMP-13) e aumentam a reabsorção óssea através da inibição dos osteoblastos e da ativação dos osteoclastos. Isso resulta na bolsa periodontal, característica clássica da periodontite, devido à inflamação gengival e à destruição dos tecidos de suporte (osso e ligamento periodontal) (66, 67).

Numerosos fatores de risco para periodontite têm sido propostos na literatura, tais como os fatores genéticos, incluindo-se aqueles relacionados a alterações nos leucócitos PMN, polimorfismos genéticos, anomalias congênitas ou hereditárias; efeitos do tabaco, dieta, hábitos de higiene bucal, estresse, doenças imunodepressoras, gravidez, medicamentos associados com o crescimento gengival e o diabetes (65).

A inflamação é o foco central da patogênese da doença periodontal e do DM. Tanto o DM1 quanto o DM2 são associados com altos níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos. Este elevado estado inflamatório contribui para complicações macro e microvasculares. Além disso, a hiperglicemia pode ativar vias que aumentam a inflamação, o estresse oxidativo e a apoptose (64).

Os mecanismos pelos quais o diabetes pode contribuir para progressão ou desenvolvimento da periodontite incluem mudanças vasculares, disfunção de neutrófilos, síntese de colágeno, predisposição genética, além de mudanças na microbiota gengival (68). Um dos mecanismos pelo qual o DM pode interferir no controle ou na presença da doença periodontal está ligado ao TNF- α , uma reconhecida citocina pró-inflamatória que dificulta a reparação óssea (5).

No aspecto bioquímico, existe uma íntima relação entre o tempo em que o organismo ficou exposto à hiperglicemia e a formação de produtos finais da glicação avançada, também chamados AGE (do inglês, *Advanced Glycated End-products*) (69). Dessa forma, quanto maior for a duração do diabetes e pior o controle glicêmico, maior será a quantidade de AGE circulando e se acumulando nos tecidos periodontais. Por conseguinte, quanto maior for o acúmulo desses produtos, maior será a expressão de receptores dos produtos finais da glicação avançada (RAGE). Os AGE têm a capacidade de se ligar aos receptores de membranas de diferentes células, os RAGE, presentes nas células endoteliais, monócitos, macrófagos, células do sistema nervoso e células musculares. Os macrófagos e monócitos sofrem um estímulo na migração para locais onde há aumento de AGE, ocorrendo a interação entre AGE e RAGE, o que leva a uma superprodução de mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6. A formação dessas moléculas causa a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), aumentando o estresse oxidativo celular. Consequentemente as alterações celulares acabam contribuindo para o dano vascular e para futuras complicações do diabetes (70-74). A associação desses dois fatores resulta em reabsorção óssea alveolar e destruição de colágeno, em virtude da diferenciação de osteoclastos e do aumento da produção de metaloproteinases da matriz, atuando assim na patogênese da doença periodontal (20).

A teoria putativa é que durante a hiperglicemia, o acúmulo de AGE induz à formação de citocinas pró-inflamatórias (tais como IL-1 β). Tal inflamação de baixo grau induzida por citocinas tem um importante papel no desenvolvimento da resistência à insulina e está envolvida no processo destrutivo da periodontite. Do mesmo modo, patógenos periodontais secretam endotoxinas que podem aumentar a quantidade de marcadores inflamatórios, tais como TNF- α , fator de necrose tumoral beta (TNF- β), IL-6, proteína C-reativa (CRP, do inglês *C-reactive protein*), fibrinogênio e IL-1 β . Elevados níveis de IL-6 e TNF- α têm sido observados no diabetes e na obesidade, e o aparecimento do DM2 pode ser previsto por um aumento dos níveis séricos de IL-6 e CRP. Além do DM2, níveis elevados de CRP também estão associados com a resistência à insulina e com a doença cardiovascular. TNF- α e IL-6 são os principais indutores de proteínas da fase aguda (por exemplo, CRP), que também prejudicam a sinalização intracelular de insulina, o que pode contribuir para a resistência à insulina. Assim, com a baixa sensibilidade à insulina, a produção de CRP ocorre, levando à destruição das células β pancreáticas através da apoptose celular, interferindo negativamente no controle glicêmico. Dessa forma, a inflamação sistêmica associada com a doença

periodontal pode promover o desenvolvimento de um estado diabético, ficando claro a relação bidirecional entre DM e doença periodontal (20).

Em suma, a hiperglicemia, tanto diretamente ou por meio da formação de AGE, causa várias modificações estruturais e funcionais nas células. As alterações na matriz extracelular podem ser tanto quantitativas como qualitativas, e podem levar a alterações na homeostase tecidual, além de modificar a resposta do hospedeiro, seja em tecidos periodontais, seja em outros tecidos bucais.

De acordo com Sonnenschein e Meyle, em uma recente revisão de literatura sobre as reações inflamatórias locais nos pacientes com diabetes e periodontite, concluíram que o conhecimento científico atual indica que a liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), a proporção alterada de RANKL/osteoprotegerina (OPG), interações de AGE/RAGE, o aumento da produção de ROS e o aumento da interação celular de leucócitos-endotélio apresentam papéis fundamentais no relacionamento bidirecional entre o diabetes e a periodontite. Estas alterações complexas, resultantes da presença de diabetes, modificam a reação inflamatória local no periodonto de pacientes com diabetes, o que conduz a um estado pró-inflamatório no tecido gengival e na microcirculação (Figura 1) (75).

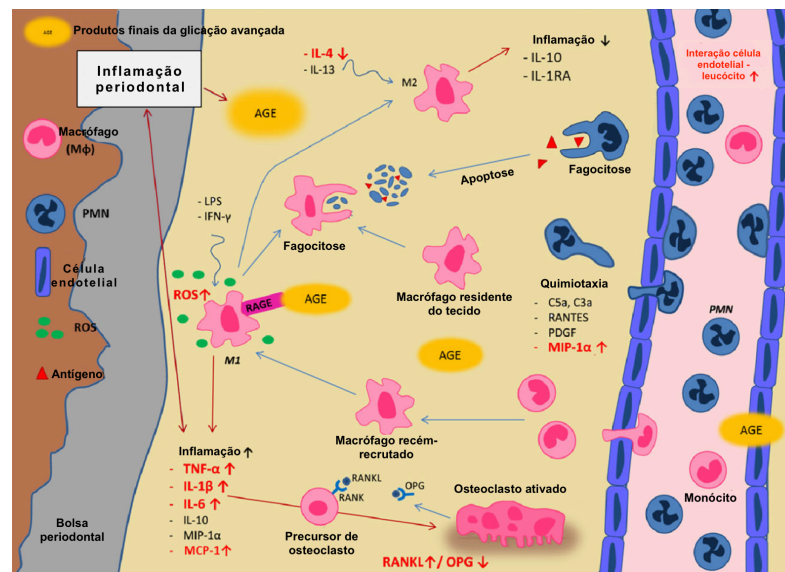


Figura 1 - Os possíveis mecanismos que ligam a inflamação periodontal e o diabetes. As citocinas alteradas em condições de diabetes são marcadas em vermelho. ↑, aumentado em comparação com condições sistemicamente saudáveis; ↓, diminuído em comparação com condições sistemicamente saudáveis (IFN- γ , o interferon-gama; IL-1RA, antagonista do receptor de interleucina 1; LPS, lipopolissacarídeo; MCP-1, proteína quimioatrativa de monócitos 1; MIP-1 α , proteína inflamatória de macrófago 1alfa; MO, macrófagos; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; RANTES, regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais).

Fonte: Sonnenschein e Meyle, 2015 (traduzido pelo autor) (75).

Além desses mecanismos, estudos têm relatado que as adipocinas podem também contribuir para a susceptibilidade do DM e da periodontite, e as propriedades pró-inflamatórias da leptina podem ser especialmente importantes para a superexpressão da inflamação do tecido periodontal em indivíduos com obesidade e /ou DM2 (27, 76).

Numerosos estudos foram realizados na tentativa de estabelecer a associação entre a doença periodontal e o DM. Muitos destes estudos envolveram a avaliação da condição periodontal em índios Pima, uma população com uma alta prevalência de DM2. Em um estudo com 3.219 indivíduos desta população, Shlossman *et al.* (77) encontraram um aumento da prevalência de periodontite diagnosticada clinicamente e radiograficamente em pacientes diabéticos (DM2) versus pacientes não-diabéticos, tendo a idade como um fator independente. Mohamed *et al.* verificaram maior prevalência de periodontite crônica, mobilidade dentária e envolvimento de furca em indivíduos com DM2, comparado com indivíduos controles não diabéticos (78). Um estudo transversal por Emrich *et al.* (79) de 1.342 indivíduos do mesmo grupo descobriram que os pacientes com DM2 foram 2,8 vezes mais propensos a desenvolver a perda de inserção clínica e 3,4 vezes mais propensos a apresentar perda óssea radiográfica em comparação com os não-diabéticos. Da mesma forma, um estudo realizado por Nelson *et al.* (80) em 2273 indivíduos Pima relataram a presença de periodontite em 60% dos indivíduos com DM2 versus em 36% dos não-diabéticos. Mais tarde, outros estudos com índios Pima encontraram uma razão de chance de risco para a progressão de periodontite de 4,2 para aqueles com diabetes e 11,4 para aqueles com diabetes mal controlada (81, 82).

Como visto, o nível de controle glicêmico é de fundamental importância para a determinação do aumento do risco da progressão de periodontite. No estudo da US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III verificou-se que adultos com um nível de HbA1c > 9%, tiveram significativamente maior prevalência de periodontite grave do que aqueles sem diabetes (OR 2,90; IC 95% 1,40 - 6,03) após o controle da idade, etnia, educação, sexo e tabagismo (83).

Taylor *et al.* em 1996, realizaram um estudo longitudinal com 88 indivíduos Pima e verificaram uma associação significativa entre a periodontite avançada e o risco de piora do controle glicêmico (hemoglobina glicada), que foi cerca de 6 vezes maior ao longo de um período de 2 anos (84). Outro estudo longitudinal avaliou o efeito da doença periodontal sobre a mortalidade relacionada com doenças cardiovasculares e a morbidade em 600 indivíduos com DM2, e descobriu que a periodontite foi associada com a doença isquêmica cardíaca e a nefropatia diabética (85).

O impacto da periodontite nas alterações de HbA1c foi avaliada em um estudo prospectivo de 5 anos em 2973 indivíduos não-diabéticos. Os participantes com periodontite mais avançada nos parâmetros iniciais de referência demonstraram um aumento absoluto de aproximadamente 5 vezes mais na HbA1c ao longo dos cinco anos do estudo em comparação com aqueles sem periodontite no início do estudo (alteração no HbA1c de $0,106 \pm 0,003\%$ versus $0,023 \pm 0,02\%$). Este foi o primeiro estudo a relatar que a periodontite prevê a progressão da HbA1c entre os indivíduos sem diabetes (86).

Várias revisões de literatura e revisões sistemáticas têm abordado a associação entre diabetes e periodontite em um nível epidemiológico. Borgnakke *et al.*, em uma revisão sistemática analisaram 17 estudos transversais, longitudinais, e não-intervencionais sobre a associação entre a doença periodontal e o DM (87). O estudo relatou pouca evidência para suportar o efeito negativo da doença periodontal sobre o controle glicêmico ou sobre as complicações do diabetes ou sobre o

desenvolvimento do DM2. Eles relataram uma série de limitações, incluindo o tamanho das amostras reduzidas e as diferenças na definição de periodontite entre os estudos (88-90).

Evidências têm sido publicadas na literatura com relação à gravidade da periodontite e às complicações de DM2. A periodontite, de moderada a grave, tem sido associada ao aumento da macroalbuminúria, à doença renal em estágio terminal, à calcificação da placa aterosclerótica, ao espessamento médio-intimal da carótida e à mortalidade cardiorenal (91). No entanto, há evidências limitadas sobre a associação entre a doença periodontal e complicações do diabetes em adultos dependentes de insulina de longa duração.

Desde o Workshop de diabetes (21) em 2013, recomenda-se focar no HbA1C como variável de resposta padrão para o controle do diabetes. Vários estudos de intervenção demonstraram que o controle do diabetes é melhorado com o tratamento da doença periodontal (92-94). Kiran *et al.* (93) realizaram um estudo randomizado controlado em 44 pacientes com DM2 e doença periodontal, que cujos diagnósticos variaram de gengivite para periodontite leve. Tratamentos com profilaxia, raspagem e alisamento radicular conseguiram uma redução de 50% na prevalência de sangramento em 3 meses e um aumento no controle glicêmico de 0,8% em comparação com os controles não tratados. Faria-Almeida *et al.* (94) demonstraram que o tratamento da doença periodontal aumentou significativamente o controle metabólico do diabetes em 6 meses de ensaio clínico controlado, ocorrendo melhorias nas variáveis clínicas e metabólicas (HbA1c) do grupo tratado. Em recente estudo intervencional longitudinal de Altamash *et al.* com 129 pacientes, verificou-se que a redução do HbA1c em indivíduos diabéticos requer um tratamento periodontal por pelo menos 6 meses (95). Na revisão sistemática de Engebretson *et al.* (34) verificaram apenas uma melhora modesta na variável HbA1C antes e após o tratamento, o que foi atribuído aos vieses dos estudos, ou seja, amostras de pequenas dimensões e diferenças nas terapias periodontais aplicadas.

2.1.2. Diabetes Mellitus e a cárie dentária

Enquanto a periodontite é um dos principais problemas de saúde bucal encontrados nos pacientes com diabetes, relatos de um aumento do risco de cárie dentária entre os indivíduos com diabetes são controversos. A maioria dos estudos que relatam a relação da cárie e pacientes diabéticos são em indivíduos DM1, enquanto poucos são os estudos que examinam a situação de cárie dentária entre pacientes DM2 (78).

Alguns estudos demonstraram que o número de dentes cariados, perdidos e obturados (CPOD) é maior entre os pacientes portadores de DM2 do que entre os indivíduos não diabéticos (96-99). Leung *et al.* (100) verificaram um risco de cárie dentária duas vezes maior em pacientes DM2, comparado a controles saudáveis. Porém, outros estudos não confirmaram tal associação (101-103).

A doença periodontal pode resultar em perda da estrutura do osso alveolar, perda do suporte dentário e uma potencial perda do dente. A perda da inserção clínica pode levar a recessão gengival, gerando uma exposição radicular para o meio bucal. Conseqüentemente, essas áreas se tornam potenciais sítios para as cáries radiculares. Entretanto, mesmo na ausência de doença periodontal, as superfícies radiculares podem ficar expostas por outros meios, como por exemplo, devido a força

excessiva durante a escovação dentária. Alguns autores relataram que pacientes com DM2 tendem a ter mais cárie radicular (101, 104, 105). Soni *et al.* (106) demonstraram que, entre 400 indivíduos com DM2, a cárie radicular estava presente em 42% dos pacientes. Por outro lado, outros estudos não verificaram diferenças em níveis de cáries radiculares entre pacientes com DM2 e indivíduos sem diabetes (103, 107).

As cáries dentárias, tanto coronária quanto radicular, geralmente se desenvolvem devido à interação da placa bacteriana, à uma dieta rica em carboidratos e a dentes ácido-suscetíveis. Enquanto algumas razões para a incidência de cárie dentária em diabéticos permanecem obscuras, alguns autores sugerem que estejam associadas ao maior número de patógenos bucais, tais como *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* na saliva. Porém, dois estudos independentes verificaram que a contagem e a distribuição de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* na saliva foram similares em indivíduos com diabetes e em controles saudáveis (103, 105). Os autores propõem que o controle dietético de indivíduos com diabetes pode reduzir o número de *Lactobacilos* na saliva, sem afetar o de *S. mutans* (103, 108). Vale destacar que uma das maiores razões para as inconsistências entre os estudos é provavelmente a falha em ajustar os fatores contribuintes, tais como status sócioeconômico e dieta.

A saúde dos tecidos bucais esta intimamente relacionada com a saliva, e tanto a composição como o fluxo salivar podem estar alterados em pacientes com diabetes (Sharon *et al.* 1985). Em diabéticos, as principais causas da maior ou menor susceptibilidade a cárie são geralmente relacionadas a mudanças salivares e elevados níveis de glicose no fluido crevicular, principalmente em pacientes com pobre controle glicêmico. Tenovuo *et al.* (108) relataram que a saliva de indivíduos com diabetes contém maiores quantidades de glicose devido à liberação de glicose do sangue para a cavidade bucal. Elevados níveis de glicose na saliva e no fluido gengival crevicular poderiam induzir um aumento no número de bactérias sacarolíticas associadas com a cárie dentária na saliva, e na placa supra e subgengival de pacientes diabéticos. A alta concentração de ácidos orgânicos produzidos pela bactéria na placa dental, como resultado do seu metabolismo da glicose, pode causar uma desmineralização na superfície dentária e conseqüentemente a cárie dentária (109). Além disso, Närhi *et al.* (110) mostraram como as taxas de fluxo de saliva e pH são diminuídas em indivíduos com diabetes.

2.1.3. Diabetes Mellitus e alterações salivares

A saliva é de suma importância para a manutenção da homeostase bucal e sistêmica. Ela exibe um papel crucial na função digestiva, no paladar, na limpeza, na hidratação da mucosa bucal e na proteção dos dentes, devido à sua capacidade tampão e às suas propriedades de remineralização. Além disso, a saliva controla a composição da microbiota bucal devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, protegendo o corpo de influências extrínsecas deletérias. A saliva é constituída em mais de 99% por água e em menos de 1% por sólidos, que são principalmente os eletrólitos e componentes proteicos, nos quais se incluem imunoglobulinas,

enzimas digestivas (tais como amilase e lipase), enzimas antibacterianas e antifúngicas, bem como as mucinas (111-113).

A saliva total compreende uma mistura de fluidos: os que são secretados pelas glândulas salivares (submandibulares, sublinguais, parótidas e glândulas salivares menores), o fluido crevicular, os transudatos da mucosa bucal e o muco da cavidade nasal e da faringe. Todos os fluidos variam em suas propriedades reológicas e na composição das suas secreções (114). Cerca de 90% da saliva é produzida pelas glândulas salivares maiores e o seu volume diário varia de 0,5 a 1,0 litros (111, 115, 116). Quando em repouso, 65% da saliva é produzida pelas glândulas submandibulares, rica em mucina, que favorece a lubrificação da mucosa. Sob estimulação, as parótidas são responsáveis por 50% do volume salivar, composto na sua maioria por água e eletrólitos (111, 115).

A secreção salivar depende do estado geral de hidratação do indivíduo. Entretanto, na prática clínica, esta secreção é afetada principalmente por medicamentos e por doenças sistêmicas (38, 111). Entre estas últimas, o DM é provavelmente uma das doenças metabólicas crônicas que mais afeta o funcionamento salivar (37), em decorrência de complicações como a microangiopatia e a neuropatia autonômica (38).

As disfunções salivares podem ser divididas em três aspectos: xerostomia, uma alteração subjetiva da salivação; hipossalivação, como uma redução objetiva do fluxo salivar; e alterações na composição salivar (117). Nos estágios iniciais, a hipossalivação é caracterizada pela diminuição do volume da saliva, além do seu aspecto ser da espesso e disperso. A mucosa bucal torna-se seca e atrófica, e os pacientes podem gradualmente apresentar disgeusia (diminuição do paladar), disfagia (dificuldade de deglutição) e disartria (dificuldade de articular palavras), bem como risco de desenvolver ulcerações, cárie, gengivite, periodontite, candidose, sialodenite bacteriana, entre outros (118, 119).

A xerostomia acomete entre 40 a 60% dos diabéticos (120). E essa prevalência, porém, costuma ser maior nos indivíduos com DM tipo 2. Isso pode ocorrer devido ao fato do paciente DM2 ter uma idade mais avançada, apresentar mais complicações a longo prazo, possuir doenças sistêmicas concomitantes e tomar mais medicações que podem causar xerostomia e/ou hipossalivação (38). Porém, a xerostomia pode ainda se manifestar como resultado de um dos sintomas clássicos do DM a poliúria, que, por conseguinte, leva à sede (120).

Estudos na literatura apontam a relação da xerostomia com a hipossalivação em indivíduos portadores de diabetes (121-123). A hipossalivação pode evoluir para mucosites, úlceras, descamações, dificuldade em usar próteses removíveis, infecções oportunistas e perda de papilas da língua, ocasionando dificuldade de mastigação, alteração do paladar e prejuízo nutricional (124, 125).

Apesar das diferenças no fluxo e na composição da saliva entre indivíduos diabéticos e não diabéticos terem sido observados em vários estudos, muitos desses achados são contraditórios na literatura.

Alguns autores verificaram que as taxas de fluxo salivar foram significativamente reduzidos em pacientes diabéticos não insulino dependentes (39-41, 126-131). Chavez et al. em 2000, investigaram o efeito do diabetes e do controle glicêmico na função salivar em 29 indivíduos com DM2 e em 23 participantes controles não diabéticos (idade entre 54-90 anos). Os resultados

demonstraram que os indivíduos diabéticos descompensados tiveram menor taxa de fluxo salivar estimulado da parótida em comparação com os diabéticos compensados e com os controles não diabéticos. Não houve diferenças significantes nas queixas de xerostomia com relação à presença de diabetes, ao controle glicêmico ou ainda às taxas de fluxos salivares (40). Após um ano de acompanhamento, os mesmos autores verificaram que os diabéticos descompensados tiveram menor fluxo salivar estimulado da parótida nos dois momentos de avaliação. Não houve alterações significantes nas taxas dos fluxos salivares ao longo do tempo com relação à presença de diabetes ou ao controle glicêmico. Indivíduos com diabetes reportaram significativamente mais reclamações de sede, porém não de xerostomia, no período de 1 ano (41).

Já Bernardi *et al.* em 2007, verificaram que a taxa de fluxo salivar foi menor nos pacientes diabéticos, independente do controle glicêmico (compensados ou descompensados), do que nos indivíduos saudáveis (129).

Dodds *et al.* analisando 233 indivíduos diabéticos tipo 2, 227 hipertensos, e 240 controles saudáveis, verificaram que os grupos diabéticos e hipertensos tiveram reduzida produção de saliva submandibular e sublingual, não estimulada e estimulada, em comparação com os controles (130).

Vasconcelos *et al.* em 2010, avaliaram as concentrações de glicose salivar e plasmática, fluxo salivar e xerostomia em 40 diabéticos tipo 2 e em 40 indivíduos não diabéticos. Dos pacientes diabéticos, 45% exibiram hipossalivação, em contraste a 2,5% dos pacientes não diabéticos. A xerostomia foi relatada em 12,5% dos pacientes diabéticos e em 5% dos pacientes não diabéticos. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos (127). No mesmo ano, Smidt *et al.* também reportaram menor fluxo salivar em repouso em indivíduos diabéticos tipo 2 (131).

Malicka *et al.* em 2014 investigaram a prevalência de sintomas de xerostomia assim como as taxas de fluxo salivares em pacientes diabéticos, de acordo com o tipo de diabetes, o nível de controle metabólico e a duração da doença. Nos diabéticos tipo 1, a taxa de fluxo salivar em repouso foi menor, e a prevalência de xerostomia foi significativamente maior em comparação com os indivíduos saudáveis. Porém, nos indivíduos diabéticos tipo 2, observou-se somente uma tendência de tais variabilidades, no qual a taxa de fluxo salivar foi um pouco menor, média de 20% menor em relação ao grupo controle (128).

Em contrapartida, outros estudos não confirmaram esses resultados (132-137). Dodds *et al.* em 1997, realizaram um estudo para determinar se a melhora do controle metabólico em um grupo de pacientes diabéticos não insulino-dependentes influenciaria a produção de saliva e sua composição. Não foram encontradas diferenças significantes nas taxas de fluxos de saliva total em repouso, saliva estimulada da parótida, na concentração de proteína da parótida e na composição da saliva entre os grupos controle e diabéticos. A atividade da amilase foi maior em diabéticos, e diminuiu com a melhora do controle glicêmico. Verificou-se também que indivíduos que relataram alterações no paladar apresentaram médias maiores nos níveis de glicose plasmática do que indivíduos com sensação de paladar normal (135).

Cristina de Lima *et al.*, em um estudo com 30 indivíduos controles e 30 diagnosticados com DM2, todos portadores de próteses totais removíveis, não observaram nenhuma diferença significativa no fluxo salivar estimulado, na retenção de próteses, ou nas lesões bucais entre os

grupos (137). Panchbhai *et al.* também não observaram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre diabéticos e indivíduos saudáveis com relação às taxas de fluxo salivar (136).

Uma vez que a secreção da saliva é controlada pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, é possível que as neuropatias diabéticas possam ter um efeito diferencial na secreção salivar, com alterações tanto nas fases fluidas como nas proteicas, dependendo do nervo comprometido. Lamey *et al.* verificaram que pacientes diabéticos com neuropatia autonômica parassimpática estabelecida e aqueles com neuropatias simpáticas e parassimpáticas combinadas apresentaram maiores taxas de fluxo salivar da parótida do que o grupo controle não diabético (133). Em contrapartida, Newrick *et al.* constataram que diabéticos com neuropatias tiveram menor taxa de fluxo da parótida do que o grupo controle ou do que os diabéticos sem neuropatias (39).

Alterações estruturais no parênquima glandular também são observadas em portadores de DM2, como atrofia acinar e infiltração adiposa (138). Estes achados podem também explicar a ocorrência de sialose e a conseqüente hipossalivação e xerostomia, que se manifestam principalmente em indivíduos com pior controle glicêmico (15, 38). Todavia, mesmo em pacientes diabéticos bem controlados, Mata e colaboradores, em 2004, verificaram que o DM pode levar a alterações marcantes na secreção (quantidade) e na composição salivares (qualidade). Ao comparar com os diabéticos tipo 1, verificou-se que os pacientes diabéticos tipo 2 apresentaram as mesmas modificações nos padrões qualitativos. Contudo, estes últimos, provavelmente por desenvolverem a doença de forma mais tardia, apresentam alterações menores do fluxo salivar (37).

Outras alterações salivares que acometem os pacientes diabéticos se referem à sua composição, e estão relacionadas principalmente à elevação dos níveis de glicose, potássio, cálcio, magnésio, proteínas, alfa-amilase, IgA, IgG e à maior atividade da peroxidase (12, 123, 127, 139).

A maior quantidade de glicose na saliva e no líquido gengival crevicular estimula o crescimento bacteriano, reduz a capacidade que os fibroblastos têm de promoverem a cura e aumenta a produção de ácido láctico. Tal aumento da glicose reduz ainda o pH e diminui a capacidade tampão da saliva. Todas essas alterações associadas à hipossalivação são fatores de risco para cárie, doença periodontal e para infecções oportunistas fúngicas, como a candidose. O elevado teor de cálcio na saliva ainda predispõe à formação de cálculo e de fatores irritativos nos tecidos periodontais (140).

Além do elevado nível de glicose na saliva, um estudo científico verificou que, em pacientes diabéticos, o Fator de Crescimento Epidérmico (FCE, do inglês, Epidermal Growth Factor - EGF) encontra-se reduzido (141). O FCE é uma proteína secretada em maiores quantidades pela saliva durante a estimulação mastigatória. Ela atua na regeneração do epitélio após agressões físicas e químicas, devido à sua grande capacidade de replicar o DNA e a neoangiogênese nas células epiteliais (142). Por isso, nos diabéticos, esta redução compromete a cura de processos inflamatórios, tornando-a mais lenta, especialmente no tocante à cura de lesões bucais e sistêmicas, como a esofagite (141). O diabético fica dessa forma muito mais vulnerável a complicações bucais.

Tendo em vista as alterações salivares e suas associações com outras condições bucais, também prevalentes nos portadores de diabetes, uma maior prioridade deveria ser dada ao diagnóstico salivar, não somente em indivíduos com diagnóstico definido, como também naqueles

com suspeita ou diagnóstico não estabelecido de Diabetes Mellitus.

2.2. Cromogranina A

A Cromogranina A (CgA) é uma proteína ácida secretora pertencente à família Granina, encontrada em vários tipos de tecidos neuroendócrinos. Ela é armazenada em vesículas secretoras com outros tipos de neurotransmissores e hormônios peptídicos. CgA é co-secretada pelos nervos simpáticos, juntamente com as catecolaminas da medula suprarrenal, e tem se mostrado útil como um marcador biológico da atividade nervosa simpática (143). A CgA é um polipeptídeo ácido com peso molecular que varia de 48 a 52 kDa (144), dependendo do seu estado de glicosilação e fosforilação. O gene que a codifica está localizado no cromossomo humano em 14q32, composto por 8 éxons separados por 7 íntrons (145).

Estudos demonstraram que a CgA, quando intracelular, tem um papel importante na regulação da formação e liberação das vesículas secretoras, estando associada ao complexo de golgi. Quando extracelular, a CgA é um polipeptídeo pró-hormonal que sofre clivagem, dando origem a peptídeos biologicamente ativos como: pancreastatina, vasostatina I e II, catestatina, cromofungina, cromacina, WE14, cromostatina, parastatina, GE25 e serpinina (146). O esquema da figura 1 representa as regiões exônicas da sequência de DNA da CgA e seus peptídeos derivados.

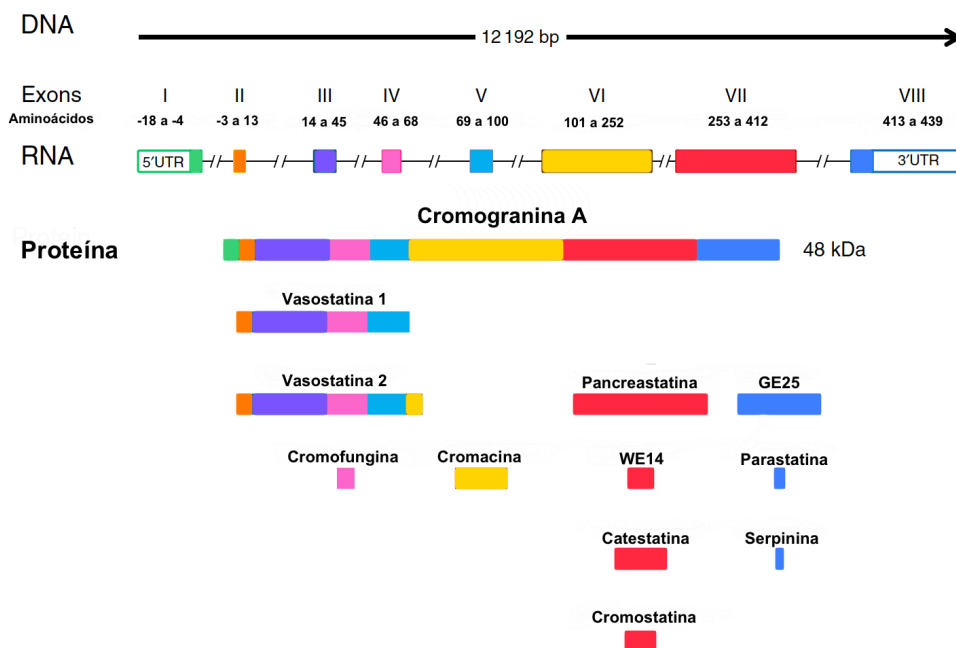


Figura 2 - Esquema das regiões exônicas da CgA e seus peptídeos derivados. O gene da CgA humana está organizado em oito éxons e sete íntrons. As clivagens proteolíticas das sequências específicas da CgA pelas convertases pró-hormônio geram vários peptídeos bioativos. Algarismos romanos indicam as sequências de éxons do RNA, ao passo que os números arábicos identificam os aminoácidos da proteína madura e do peptídeo sinal (146).

O 5'-UTR (259 pb) do RNAm da CgA e a maior parte do peptídeo sinal da CgA correspondem ao éxon I. A β -Granina representa o domínio amino-terminal altamente conservado da CgA codificado pelos éxons II-V, e alguns aminoácidos codificados pelo éxon VI. Ele engloba vários peptídeos bioativos: vasostatina 1 (VST1: hCgA1-76) e vasostatina 2 (VST2: hCgA1-113) apresentando propriedades vasodilatadoras e cardiosupressivas. A Cromofungina corresponde à sequência de Arg (147) -Leu (148) de toda a proteína. Ela interage com a parede celular, atravessa a membrana plasmática, acumula-se no micro-organismo, e inibe a atividade de calcineurina. A Cromacina, tipo mais variável dos peptídeos, inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em bovinos, e representa um marcador geral de tumores neuroendócrinos (149). O éxon VII codifica o hormônio disglucêmico pancreastatina (PST: hCgA250-301), o peptídeo anti-hipertensivo catestatina, um produto de clivagem de 20 aminoácidos que parece estar envolvido nas funções das células β pancreáticas conhecido como cromostatina, e o peptídeo de 14 aminoácidos WE14 (hCgA324-337). O nome desta molécula é derivado da presença de triptofano (W) na posição N-terminal e do ácido glutâmico (E) na posição C-terminal; ele modula a liberação de histamina dos mastócitos peritoneais de ratos, e atua como auto-antígeno no diabetes tipo 1 (150). O éxon VIII codifica GE25, parastatina e serpinina. O GE25, cuja bioatividade ainda não foi determinada, é expressa pela glândula pituitária, intestino e pâncreas. Parastatina corresponde aos resíduos 347-419 da CgA e é secretada em conjunto com vários sub-fragmentos pelas glândulas paratireoides. Ela parece estar envolvida em um loop de realimentação negativa, uma vez que inibe tanto o hormônio da paratireoide como a secreção da CgA. A Serpinina, que corresponde ao final da posição C-terminal de CgA (hCgA403-428), regula a biogênese granular em células endócrinas e neuronais pela inibição da degradação proteica de grânulos do complexo de Golgi e exerce um efeito protetor contra o estresse oxidativo. A influência de Serpinina foi recentemente relatada na atividade cardíaca (151).

Tanto o padrão quanto a taxa de processamento da CgA variam de forma tecido-específica. Na medula adrenal e na glândula pituitária anterior, sua taxa e seu processamento são baixos, enquanto no tecido endócrino pancreático e em tecidos gastrointestinais, a CgA é processada mais rápida e mais extensivamente. O processamento proteolítico de CgA também pode ocorrer após sua liberação pelas células neuroendócrinas (146).

A pancreastatina foi o primeiro peptídeo derivado da CgA a ser identificado, e é conhecida como um peptídeo que inibe a primeira fase de secreção da insulina estimulada pela glicose. Funakoshi *et al.* em 1990, estudaram os níveis de PST em jejum e após a ingestão de glicose oral em pacientes com DM não insulino-dependentes utilizando um radioimunoensaio específico para PST. Os níveis de PST, em jejum, em diabéticos não insulino-dependentes, não diferiram dos indivíduos controles. Nenhum aumento significativo de PST no plasma foi observado após a ingestão de glicose em controles saudáveis. Em contrapartida, os níveis plasmáticos de PST em diabéticos não insulino-dependentes foi significativamente aumentado após a ingestão de glicose. Estes resultados sugerem que a hipersecreção de PST em indivíduos diabéticos não insulino-dependentes pode contribuir para a inibição da secreção de insulina estimulada pela glicose e para a indução da hiperglicemia (152).

Ao longo dos anos, os estudos têm documentado os valores clínicos das dosagens de CgA no sangue como marcadores para doenças associadas às células neuroendócrinas, doenças vasculares, diabetes e outras (43-45). A produção de CgA também tem sido encontrada nas glândulas salivares submandibulares de humanos (145). Shigeyama *et al.* (53) verificaram que indivíduos com a boca seca apresentaram níveis salivares maiores de cortisol e CgA em comparação com aqueles com normossialia, o que sugere uma associação dos marcadores estudados com os sintomas da xerostomia e o menor fluxo salivar.

Hironaka *et al.* em 2008, investigaram os níveis de CgA salivar em uma população idosa de pacientes com periodontite, e encontraram altos níveis de CgA nos indivíduos com perda de inserção clínica grave (54). Haririan *et al.* (2012) também encontraram altos níveis de CgA e cortisol na saliva de pacientes com periodontite agressiva, comparados com aqueles pacientes com periodontite crônica e indivíduos saudáveis (55).

A correlação entre as proteínas antimicrobianas, a resposta imune inata e o diabetes não é bem compreendida. Soell *et al.* verificaram uma superexpressão de CgA na saliva dos 30 pacientes diabéticos tipo 2 avaliados (45). Alguns estudos na literatura sugerem, por exemplo, testar biomarcadores não-invasivos para o diabetes, correlacionando diabetes com a concentração de CgA na saliva (45).

Como visto anteriormente, o Diabetes *Mellitus* tem sido consistentemente associado às alterações na composição e na função da saliva, que por sua vez geram um rompimento na homeostasia da cavidade bucal (37, 40, 127, 129, 153, 154). Sabe-se que as glândulas salivares respondem aos estímulos do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático) e que a CgA é uma proteína ácida co-liberada por exocitose da medula suprarrenal e das terminações nervosas simpáticas (145). Nesse contexto, comparar o perfil genético da CgA entre indivíduos saudáveis e portadores de DM tipo 2, e correlacionar a concentração desta proteína com o fluxo salivar, poderão facilitar o diagnóstico de diabetes por meio desse biomarcador não invasivo. Até o presente momento, a relação da CgA com os indicadores de saúde bucal em pacientes DM2 não foi relatada na literatura. Adicione-se a isso, o fato que ainda poderão verificar se alterações, como a hipossialia e a doença periodontal, têm relação com a CgA.

3. *Objetivos*

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

3.1.1. Avaliar os potenciais efeitos do DM2 nas alterações salivar, dentária e status periodontal, de acordo com o controle glicêmico.

3.1.2. Comparar a concentração e o perfil genético da CgA entre pacientes DM2 (compensados e descompensados) e indivíduos sem diabetes.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Quantificar a CgA plasmática e salivar em indivíduos não diabéticos e em portadores de DM2.

3.2.2. Avaliar a possível associação entre a concentração proteica de CgA e os fluxos salivares em indivíduos não diabéticos e em portadores de DM2.

3.2.3. Avaliar a possível associação entre a concentração proteica de CgA e a condição periodontal em indivíduos não diabéticos e em portadores de DM2.

3.2.4. Comparar o perfil genético da CgA em indivíduos não diabéticos e em portadores de DM2.

3.2.5. Investigar a possível associação entre os polimorfismos do gene cromogranina A e as alterações dos fluxos salivares em indivíduos não diabéticos e em pacientes portadores de DM2.

4. Pacientes e Método

4. PACIENTES E MÉTODO

O cumprimento dos preceitos éticos em pesquisa foi conduzido conforme a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e de acordo com os princípios estabelecidos pela Declaração de Helsinki. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Católica de Brasília – UCB (parecer nº. 160/11 - Anexo A). Após os objetivos e a metodologia do estudo terem sido explicados para cada participante, os termos de consentimento livre e esclarecido foram obtidos.

População do estudo

Os sujeitos desse estudo transversal foram selecionados entre indivíduos sem diabetes e portadores de DM2, de ambos os gêneros, com idades entre 34 e 70 anos. Todos os pacientes foram selecionados entre aqueles que procuraram tratamento odontológico nas clínicas da UCB.

Cálculo Amostral

Estimou-se que, para uma amostra com 28 pacientes em cada grupo, o estudo teria um poder de 80% para detectar uma diferença clinicamente significativa entre os grupos no valor médio sobre a CgA, assumindo uma diferença máxima nos valores médios entre os grupos de 0,34 pmol/mL, com um desvio padrão intra grupo igual a 0,25 pmol/mL (com base em dados preliminares), ao nível de significância $p < 0,05$.

Amostra

Foi realizada uma amostragem não probabilística por conveniência. Inicialmente, um total de 309 indivíduos diabéticos e 55 indivíduos sem diabetes participaram dos exames bucais e sistêmicos, no período entre agosto de 2011 e dezembro de 2013. Um total de 107 indivíduos foi excluído do estudo por não preencher os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão

Grupo dos diabéticos:

- Indivíduos com diagnóstico médico confirmado de DM2, voluntários, que concordaram e assinaram o termo de consentimento informado.

Grupo controle:

- Indivíduos voluntários sem diabetes, sem prescrição medicamentosa de antibióticos (pelo menos 3 meses antes dos exames), anti-inflamatórios, vitaminas e analgésicos (ingeridos dentro de 24 horas precedentes as coletas) e que concordaram em assinar o termo de consentimento informado.

Critérios de exclusão

- Pacientes transplantados e/ou epiléticos; grávidas; portadores de demência; usuários de drogas ilícitas; usuários de dispositivos eletrônicos como: marca passo, bomba de insulina e dreno

cerebral; pacientes com dificuldade de coordenação motora; com presença de lesões bucais e faciais suspeitas de malignidade; com presença de condições sistêmicas que pudessem influenciar a fisiologia da glândula salivar, tais como: hipotireoidismo, história de radioterapia nas regiões de cabeça e pescoço e tratamento de quimioterapia iniciado há mais de 3 meses.

Dados dos Níveis Glicêmicos

Todos os participantes realizaram exames laboratoriais de glicemia em jejum (GJ; mg/dL) e testes de hemoglobina glicada (HbA1c; %), analisados e processados no laboratório de biomedicina da UCB. Previamente à coleta, os pacientes foram instruídos a realizar um jejum de 8 horas. Os pacientes diabéticos foram divididos em dois grupos de acordo com o nível de controle glicêmico, baseados nos critérios estabelecidos pela American Diabetes Association (ADA) (155). Para avaliação do controle metabólico foram utilizados os testes de HbA1C realizados em um período menor do que 3 meses antes da coleta salivar. Desta forma, o grupo 1 foi composto por pacientes diabéticos tipo 2 compensados, ou seja, que apresentaram bom controle glicêmico, considerando os valores de HbA1c < 7%. O grupo 2 compreendeu pacientes diabéticos tipo 2 descompensados, com HbA1c ≥ 7%.

História Clínica Progressa

Cada indivíduo respondeu a um questionário detalhado para coleta de dados sócio-demográficos, avaliação da saúde geral, controle do diabetes, tempo da doença, antecedentes familiares, estilo de vida, tabagismo, etilismo, tipo e quantidade de medicações utilizadas e questões relacionadas à secura da boca, dos olhos e da pele (Apêndice A e B). Cada medicamento utilizado pelos pacientes foi classificado de acordo com o grupo anatômico principal do sistema de classificação ATC (do inglês, Anatomical Therapeutic Clinical).

Dados antropométricos e sinais vitais

Avaliações antropométricas incluíram medidas do peso (kg) e altura (m) para o cálculo do índice de massa corpórea (IMC; peso/Altura²). Posteriormente, foram aferidos os níveis de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) de cada participante.

Avaliação Odontológica

Todos os exames foram realizados na Clínica Odontológica da UCB (Campus I – Taguatinga). Anteriormente às análises odontológicas, testes de glicemia capilar foram realizados para prevenir intercorrências como hipoglicemia ou cetoacidose. O índice de placa visível foi o primeiro exame a ser realizado, para evitar, que durante as coletas salivares, o biofilme pudesse ser removido, resultando em um falso negativo. O Índice de placa visível (IPV), descrito por Ainamo e Bay, foi adotado (156), preconizando-se a análise de todas as superfícies lisas dos dentes (mesial, vestibular, distal e lingual) de modo a reconhecer a placa bacteriana sem o auxílio de substâncias

evidenciadoras. Considerou-se portanto apenas a presença ou ausência de placa visível à secagem. Dessa forma, o IPV foi determinado em porcentagem:

$$\text{IPV} = \frac{\text{número de superfícies com placa} \times 100}{\text{número de superfícies examinadas}}$$

Testes salivares

Todas as coletas salivares foram realizadas no período matutino (das 8:00 às 11:00 horas) para minimizar o efeito dos ritmos circadianos. Previamente às coletas, os pacientes foram instruídos a não comer, não beber, não fumar e a higienizar a boca sem o uso de soluções antissépticas ao menos 2 horas antes do exame, para evitar qualquer tipo de contaminação nas amostras de saliva.

Considerando que 1 grama corresponde a 1 mL de saliva, a diferença de peso do frasco de coleta, antes e após a coleta, dividido pelo período de tempo utilizado, forneceu os valores para o fluxo salivar total em repouso (STR) e fluxo salivar total estimulada (STE). A taxa de fluxo salivar não estimulado das glândulas salivares da mucosa labial superior (SLS) foi expressa em microlitros por centímetro quadrado por minuto ($\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$) devido à pequena quantidade de SLS. Foi utilizada uma balança analítica (Mark 250A, Marca Bel Engineering, Itália) para pesar os frascos de coleta.

Técnica de coleta do fluxo salivar da mucosa labial superior (SLS)

A SLS foi coletada pelo método de pesagem de tiras de teste de *Schirmer* (Ophthalmos Indústria, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3) (157). Pacientes portadores de prótese total e/ou prótese parcial removível superior foram instruídos a remover suas próteses durante este exame. Inicialmente, uma tira de *Schirmer* estéril foi pesada na balança analítica digital (Figura 4). Roletes de algodão foram colocados bilateralmente na região dos ductos de *Stenon* das glândulas parótidas, na altura dos segundos molares superiores, com o intuito de evitar a contaminação da tira pela saliva produzida em outras regiões (Figura 5). A mucosa labial superior e o rebordo gengival da região dos dentes canino superior esquerdo ao direito foram cuidadosamente secos com ar comprimido. Logo em seguida, a tira de teste de *Schirmer* foi posicionada horizontalmente sobre o rebordo e paralelamente às coroas dentárias (Figura 6A), permitindo que a tira fosse recoberta pelo lábio (Figura 6B). O participante foi orientado a manter a boca aberta e a respirar pelo nariz durante 1 minuto. Após esse período a tira foi removida e imediatamente pesada para evitar perda de peso por evaporação (Figura 7).

O valor do peso final foi subtraído pelo valor inicial da tira. Uma vez que a área total da tira de *Schirmer* é de 3 cm^2 , o valor da taxa de secreção encontrado foi dividido por 3 para que fosse obtida a unidade de medição correspondente à $\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$. O seguinte critério foi utilizado para classificar a atividade funcional glandular (157):

- hipossialia: 2,4 a $3,9 \mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$
- hipossialia parcial: $> 3,9$ a $< 7,6 \mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$
- normossialia: 7,6 a $10,5 \mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$



Figura 3 - Tiras de teste de Schirmer (Ophthalmos Indústria, São Paulo, SP, Brasil).

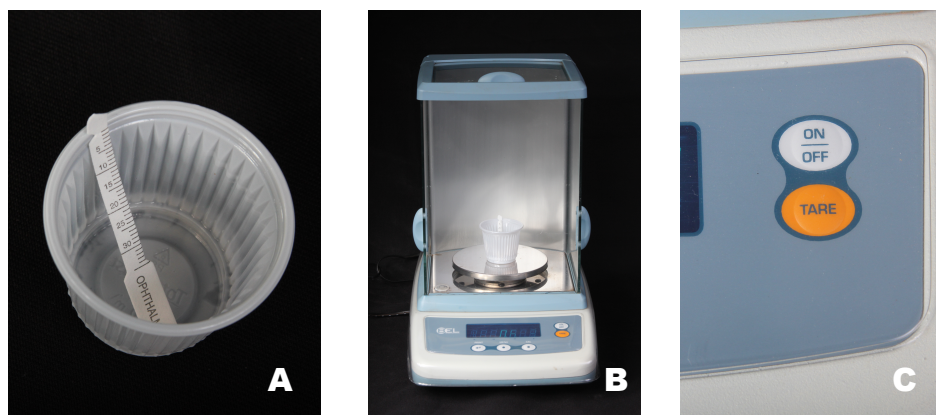


Figura 4 – Tira de Schirmer colocada em um copo descartável (A) e pesada previamente a coleta salivar em uma balança analítica digital (B). Em seguida, tarou-se a balança (C).



Figura 5 - Roletes de algodão colocados bilateralmente na região dos ductos de Stenon das glândulas parótidas, na altura dos segundos molares superiores.

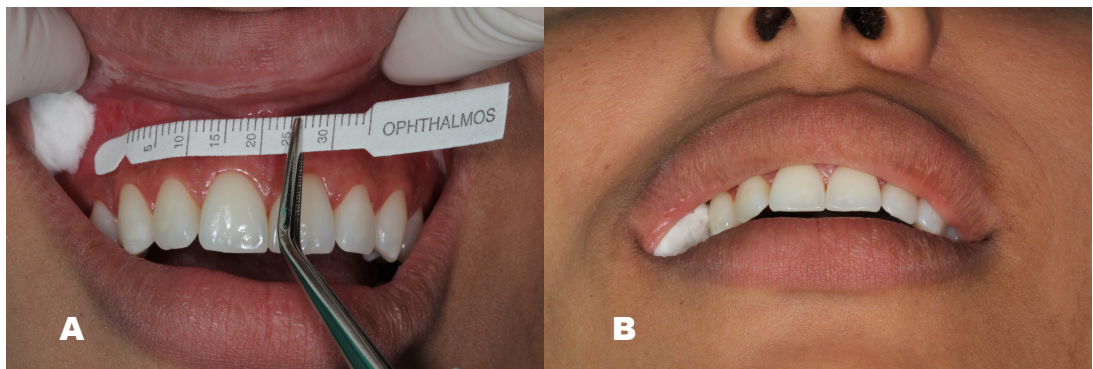


Figura 6 - Posicionamento da tira de *Schirmer* para avaliação salivar das glândulas salivares menores do lábio superior (A). Recobrimento da tira com o lábio (B).



Figura 7 - Tira de *Schirmer* pesada após a avaliação salivar.

Técnica da coleta do fluxo salivar total em repouso (STR)

Durante a coleta, o paciente permaneceu sentado, com os olhos abertos e com o pescoço inclinado frontalmente para baixo a fim de favorecer o escoamento “passivo” da saliva, que foi depositada em um coletor universal descartável, esterilizado e previamente pesado (figura 8 e 9). Além disso, o indivíduo foi instruído a não conversar, nem deglutir a saliva secretada durante os 5 minutos de coleta. O coletor foi pesado novamente (figura 10) e, subtraído o valor do peso inicial, o volume coletado resultante foi então dividido pelo tempo da coleta, estabelecendo-se o padrão de secreção do paciente de acordo com o volume salivar secretado por minuto (mL/min) (157):

- hipossalivação: < 0,1 mL/min
- hipossalialia parcial \geq 0,1 mL/min e < 0,3mL/min
- normossalialia: 0,3 a 0,6mL/min

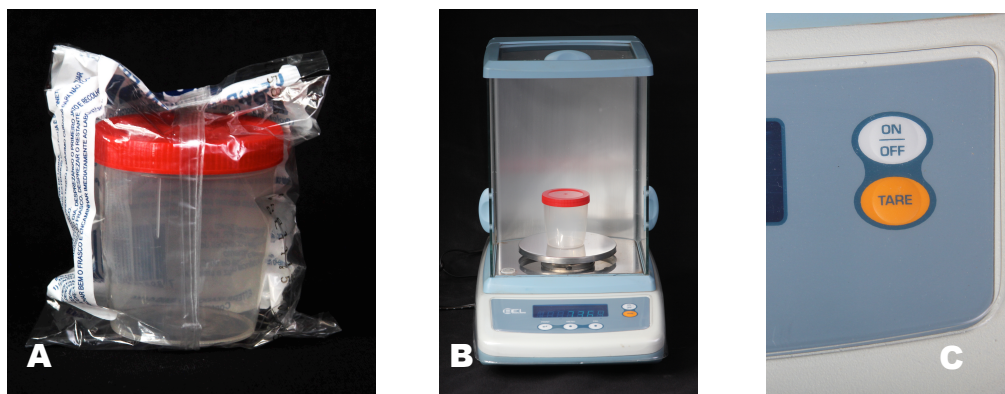


Figura 8 – Coletor universal descartável e esterilizado (A). Coletor universal previamente pesado (B). Após a pesagem, tarou-se a balança (C).



Figura 9 – Escoamento passivo da saliva em repouso durante 5 minutos.



Figura 10 – O coletor foi pesado novamente após a coleta salivar e o fluxo salivar em repouso foi determinado.

Técnica de coleta do fluxo salivar total estimulada (STE)

A STE foi obtida por meio de estímulo mecânico (figura 11 a 14), ou seja, o paciente foi instruído a colocar um dispositivo de silicone de 1 cm de comprimento dentro da boca segurando-o por um fio dental para evitar a sua ingestão. O paciente mastigou o dispositivo por 5 minutos, sem soltar o fio dental. Durante o período da coleta, foi recomendado que o paciente não engolissem a saliva que se formava, e que a depositasse no coletor universal esterilizado sempre quando desejasse. O volume coletado foi dividido pelo tempo da coleta para se estabelecer o padrão de secreção do paciente de acordo com o volume salivar secretado por minuto (mL/min) (157):

- hipossalivação: < 0,7 mL/min
- hipossaliva parcial $\geq 0,7$ mL/min e < 1,0 mL/min
- normossaliva: $\geq 1,0$ mL/min

Os indivíduos usuários de próteses total e/ou parcial removível foram instruídos a manter seus aparelhos protéticos na boca durante todo o período das coletas de STR e STE.



Figura 11 – Coletor universal descartável e esterilizado (A). Coletor universal previamente pesado (B). Após a pesagem, tarou-se a balança (C).

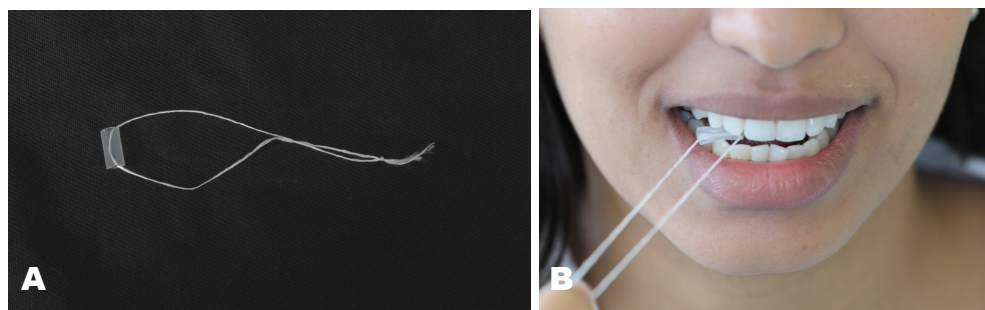


Figura 12 - Dispositivo estéril de silicone de 1 cm de comprimento envolto por um fio dental (A). Ilustração do paciente utilizando o dispositivo (B).



Figura 13 – O paciente foi instruído a mastigar o dispositivo por 5 minutos, sem soltar o fio dental. Durante o período da coleta, foi recomendado que o paciente não engolisse a saliva que se formava, e que a depositasse no coletor universal esterilizado sempre quando desejasse.

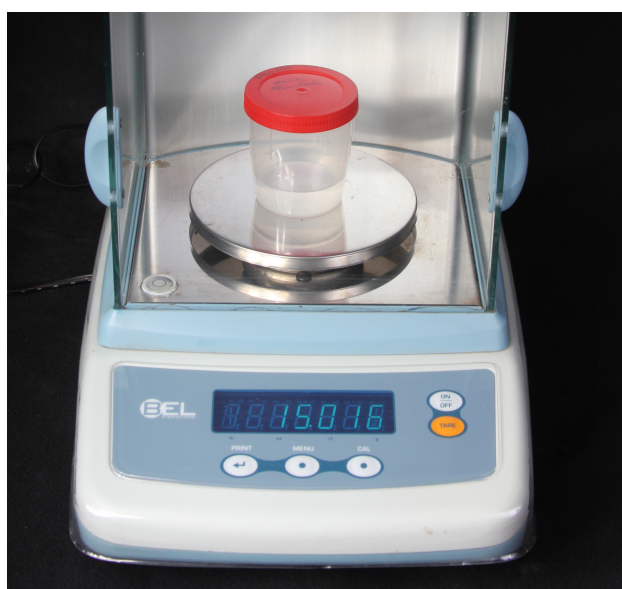


Figura 14 - Nova pesagem do coletor após coleta e determinação do fluxo salivar estimulado.

Técnica de avaliação da capacidade tampão

A análise qualitativa da saliva consistiu na avaliação da capacidade tampão. A capacidade tampão foi avaliada após a adição de 3 ml de ácido clorídrico 0,005M em 1 ml de saliva não estimulada. Após 2 minutos, o pH foi verificado por meio de fita indicadora com diferentes escalas (PH FIX test strips, MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) (Figura 15). Os valores de pH inferiores a 4,5 foram considerados de baixa capacidade tampão (137).

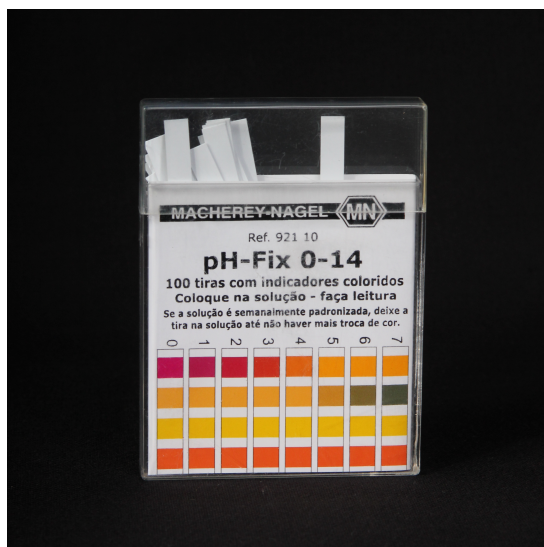


Figura 15 - Fita indicadora com diferentes escalas de cor (PH FIX test strips, MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany).

Exame Clínico Intra-bucal

Os exames bucais iniciais foram realizados por um único dentista. Foram avaliados: mucosa bucal; língua; número de dentes perdidos, presença de cárie coronária e radicular, restauração coronária e radicular (índice CPOD médio); e próteses fixas e removíveis (de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde - OMS). O índice CPOD médio foi representado pelos escores do total de número de dentes cariados, perdidos ou obturados (dentição permanente) (Apêndice C).

Para avaliação da condição periodontal, todos os exames periodontais foram realizados por dois dentistas previamente treinados e calibrados. A profundidade de sondagem (PS), o índice de sangramento à sondagem (ISS), a recessão gengival e a perda de inserção clínica (PIC) foram mensurados com uma sonda periodontal milimetrada North Carolina (UNC-15 probe, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA). Todos os dentes foram sondados em 6 sítios: méso-palatino (méso-lingual), palatino (lingual), disto-palatino (disto-lingual), méso-vestibular, vestibular e disto-vestibular. A profundidade de sondagem foi definida como sendo a distância da margem gengival e a porção mais apical sondável da bolsa/sulco (158). O índice de sangramento à sondagem foi mensurado como ausente ou presente. A profundidade de sondagem foi combinada à recessão gengival para calcular a perda de inserção clínica (PIC) por sítio. Os dados obtidos foram anotados no periograma do paciente (Anexo B). PS e PIC foram categorizadas em ≤ 3 mm, 4 mm, 5 a 6mm e ≥ 7 mm. A periodontite severa foi definida como $PIC \geq 5$ mm (159).

Avaliação da repetibilidade inter e intraexaminadores

Antes de iniciar a pesquisa propriamente dita, uma concordância inter e intra-examinadores foi verificada por meio dos testes de coeficiente de correlação e pelo índice Kappa ponderado. Previamente aos exames periodontais, os dois examinadores fizeram exercícios de treinamento de todos os protocolos do estudo. Discordâncias foram resolvidas por discussão entre os examinadores.

Após o treinamento, repetidos exames foram conduzidos pelos dentistas até se conseguir uma concordância entre 80 e 90% nas medidas repetidas de todos os protocolos de exame. Para as sessões de calibração, 14 pacientes selecionados da Clínica de Odontologia Integrada da UCB foram avaliados em dois momentos, com intervalo de 1 semana entre o primeiro e o segundo exame. As concordâncias intra e interexaminador foram avaliadas pelo coeficiente de correlação intraclass das médias das variáveis profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção (PIC), sendo de 0,981 para o examinador 1, e de 0,976 para o examinador 2 ($p < 0,001$). O coeficiente de correlação interclass, do examinador 1 contra 2 foi de 0,964 para o primeiro momento e de 0,963 para o segundo momento. ($p < 0,001$).

Os coeficientes de correlação intra e interclass foram de 0,914 e 0,886 ($p < 0,001$) para PS, respectivamente, e de 0,979 e 0,956 ($p < 0,001$) para PIC, respectivamente.

A confiabilidade interexaminadores para a profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção clínica (PIC) tiveram um índice Kappa ponderado de 0,508 e 0,703 ($p < 0,05$), respectivamente. Além disso, a confiabilidade intra-examinador apresentou um índice Kappa de 0,679 para PS e 0,842 para PIC, respectivamente ($p < 0,001$). De acordo com a classificação de Landis e Koch (160) os valores do coeficiente Kappa foram interpretados como: concordância pobre ($\kappa < 0$), ligeira concordância ($\kappa = 0 - 0,20$), concordância fraca ($\kappa = 0,21 - 0,40$), concordância moderada ($\kappa = 0,41 - 0,60$), concordância substancial ($\kappa = 0,60 - 0,80$) e concordância excelente ($\kappa > 0,80$).

Coleta de sangue para análise da CgA plasmática

A coleta do sangue periférico foi realizada por meio de um tubo com EDTA (BD. Franklin Lakes, NJ, EUA), e feita posteriormente aos testes salivares para minimizar possíveis alterações nos biomarcadores salivares devido a uma possível reação de ansiedade para a coleta do sangue.

Processamento das amostras

Os volumes das salivas (STR e STE) foram conferidos por meio de pipetas graduadas de vidro e posteriormente foram colocados em tubos de polipropileno do tipo Falcon de 15 mL (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As amostras de sangue e saliva estimulada foram centrifugadas a 3000 rpm (1620xg), por 5 min, a 4°C (Centrifuge 5804 R, marca Eppendorf AG Hamburgo, Alemanha). Os sobrenadantes do plasma e saliva foram imediatamente coletados e aliqüotados em tubos eppendorfs e congelados a -80°C até sua análise.

Análises laboratoriais da Cromogranina A

Análise da concentração da CgA na saliva e no plasma sanguíneo

As concentrações da CgA na saliva e no plasma sanguíneo (pmol/mL) foram determinadas utilizando-se o kit YK070 Chromogranin A (Human) EIA (Yanaihara Institute Inc., Japan) com um limite inferior de sensibilidade de 0,01 pmol/mL, de acordo com as recomendações do fabricante.

Ensaio do polimorfismo de nucleotídeo simples da CGA

Todas as amostras foram coletadas por punção venosa para isolamento do DNA. O DNA foi extraído de sangue periférico e saliva com uso do kit *Invisorb Spin Blood – Mini Kit* (250) da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A concentração de DNA foi determinada através da corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/μL. Em seguida, o DNA diluído foi submetido à estratégia PCR (*Polymorphism Polymerase Chain Reaction*) para estudo da distribuição dos SNPs.

A técnica da PCR permite que as regiões selecionadas do genoma para o gene CgA (rs9658635 na região promotora e Glu264Asp no éxon 6-rs9658655) sejam amplificadas milhões de vezes. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar os polimorfismos foram, respectivamente:

rs9658635: Forward-5'CCTAGATATTGGAGAGAGCCATGAGTGA 3' e Reverse-5' CCATGTGTACTGAGGTCCCTGGCAG 3'

rs9658655: Forward-5' AGGGTGGCAGGCAAAGAG 3' e Reverse-5' AAGGTGGAATGAGGTTATGG 3'

As condições de termociclagem foram 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 64°C (rs9658635) ou 56°C(rs9658655) por 45 segundos e 72°C por 60 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi o Termociclador Techne modelo TC-512.

Em cada reação foram utilizados 4,0μL de DNA genômico na concentração final de 2,5ng/μL; 2,5μL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl); 0,5μL de MgCl₂ 50mM (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 0,5μL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs; 2,5mM; (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil); 0,5μL de Taq-Polimerase, (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 5U/μL); 1,5μL de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (10μM, *IDT technologies*); completando com água Milli-Q para um volume final de 25μL por reação.

Após a confirmação do sucesso da amplificação pelo PCR cada produto foi digerido a 37 °C por 3h com as enzimas de restrição 5 U Bcc I (rs9658635) ou BfuC I (rs9658655) (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Para os fragmentos de restrição do polimorfismo rs9658635 foram 114 e 21 pares de base (pb) para o alelo T, e 135 pb para o alelo C. Para os fragmentos de restrição do polimorfismo Glu264Asp foram 129 e 106 pb para o alelo G, e 235 pb para o alelo C (161).

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio na potência de 100W por 30 minutos.

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do programa estatístico SPSS versão 20.0 (SPSS Inc, IBM Company, Chicago, IL, EUA). Variáveis demográficas e parâmetros clínicos foram apresentados como média ± desvio padrão ou mediana e percentis em cada grupo. Para avaliar as diferenças entre

grupos, foi verificada a normalidade dos dados (pelo teste de Shapiro-Wilk) e, quando atendido o pressuposto, foi utilizado o teste ANOVA a 1 critério com pós teste de Tukey. Quando o teste de normalidade não foi atendido, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Os testes t de Student, U de Mann-Whitney, qui-quadrado para as variáveis categóricas, e estimativa de risco pelo Odds Ratio (OR), com intervalo de confiança (IC) 95%, foram calculados quando apropriados. Para verificar a existência de correlação entre os parâmetros, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância foi de $p < 0,05$ para todas as análises.

5. Resultados

5. RESULTADOS

Após análise inicial da amostra, e de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do estudo, 257 indivíduos foram considerados elegíveis. Desses, 147 foram excluídos por causas diversas, como: dados insuficientes (n=49), recusa em participar de todos os testes (n=41), e visando o pareamento das idades e sexos entre os grupos (n=57). Como resultado, a amostra final foi constituída de um total de 110 indivíduos pareados por sexo e idade, divididos em três grupos: 38 indivíduos controle (sem DM), 36 pacientes DM2 compensados e 36 pacientes DM2 descompensados.

Características sociodemográficas, clínicas e metabólicas

A Tabela 1 descreve as características sociodemográficas e os parâmetros clínicos gerais dos grupos estudados.

Tabela 1- Características sociodemográficas e parâmetros clínicos gerais da amostra.

Variáveis	Grupos			p
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Número de indivíduos (n)	38	36	36	N/A
Idade, anos (Mediana) (1° quartil; 3° quartil)	51,00 (50,00; 56,75)	57,50 (51,75; 62,00)	56,50 (48,00; 64,00)	0,050 [†]
Gênero (Homem/Mulher) (n) (%)	18/ 20 47,37/ 52,63	12/ 24 33,33/ 66,67	13/ 23 36,11/ 63,89	0,421 [§]
Estado civil				
solteiro (%) (n)	15,79 (6)	16,67 (6)	11,11 (4)	0,771 [§]
casado (%) (n)	68,42 (26)	58,33 (21)	66,67 (24)	0,629 [§]
divorciado/separado (%) (n)	10,53(4)	13,89 (5)	16,67 (6)	0,743 [§]
união estável (%) (n)	2,63 (1)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,384 [§]
viúvo (%) (n)	2,63 (1)	11,11 (4)	5,56 (2)	0,318 [§]
Grau de escolaridade				
Analfabeto (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	8,33 (3)	0,151 [§]
1 grau incompleto (%) (n)	23,68 (9)	50,00 (18)	27,78 (10)	0,038 ^{§*}
1 grau completo (%) (n)	23,68 (9)	13,89 (5)	19,44 (7)	0,562 [§]
2 grau incompleto (%) (n)	5,26 (2)	5,56 (2)	2,78 (1)	0,823 [§]
2 grau completo (%) (n)	36,84 (14)	16,67 (6)	38,89 (14)	0,077 [§]
Superior incompleto (%) (n)	7,89 (3)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,183 [§]
Superior completo (%) (n)	2,63 (1)	8,33 (3)	2,78 (1)	0,413 [§]
Situação atual de emprego				
Não empregado (%) (n)	39,47 (15)	66,67 (24)	47,22 (17)	0,056 [§]
Empregado (%) (n)	60,53 (23)	33,33 (12)	52,78 (19)	
História de tabagismo				
Não fumante (%) (n)	57,89 (22)	66,67 (24)	66,67 (24)	0,661 [§]

Fumante (%) (n)	21,05 (8)	2,78 (1)	11,11 (4)	0,051 [§]
Ex-fumante (%) (n)	21,05 (8)	30,56 (11)	22,22 (8)	0,589 [§]
História de etilismo				
Não etilista (%) (n)	65,79 (25)	69,44 (25)	72,22 (26)	0,511 [§]
Etilista (%) (n)	23,68 (9)	22,22 (8)	13,89 (5)	0,529 [§]
Ex-etilista (%) (n)	10,53 (4)	8,33 (3)	13,89 (5)	0,748 [§]
IMC, Kg/m ² (Média ± DP)	25,41 ± 4,05 ^a	28,04 ± 4,73 ^d	29,53 ± 5,05 ^d	0,001^{#*}
Abaixo do peso (%) (n)	2,63 (1)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,384 [§]
Peso normal (%) (n)	50,00 (19) ^a	30,56 (11) ^{a,b}	19,44 (7) ^b	0,019^{§*}
Acima do peso (%) (n)	31,58 (12)	44,44 (16)	38,89 (14)	0,143 [§]
Obesidade grau I (%) (n)	13,16 (5)	13,89 (5)	25,00 (9)	0,326 [§]
Obesidade grau II (%) (n)	2,63 (1)	11,11 (4)	13,89 (5)	0,212 [§]
Obesidade mórbida (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,354 [§]
FC, bpm (Média ± DP)	62,61 ± 9,57	65,53 ± 12,68	69,36 ± 16,41	0,091 [#]
FR, irpm (Média ± DP)	18,92 ± 3,99	20,42 ± 5,84	20,33 ± 4,93	0,476 [#]
PAS, mmHg (Mediana)	130,00 ^a	130,00 ^{a,b}	140,00 ^b	0,013^{†*}
(1° quartil; 3° quartil)	(120,00; 137,50)	(120,00; 142,50)	(130,00; 140,00)	
PAD, mmHg (Mediana)	80,00	80,00	80,00	0,312 [†]
(1° quartil; 3° quartil)	(80,00; 90,00)	(80,00; 90,00)	(80,00; 90,00)	

N/A = não se aplica, † Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, § Teste Qui-quadrado, # ANOVA a 1 critério com pós teste de Tukey, * P<0.05.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos.

No parâmetro IMC, os grupos dos diabéticos apresentaram médias significativamente maiores em relação ao grupo controle, independente do controle glicêmico (p=0,001), enquanto a PAS foi significativamente maior no grupo de DM2 descompensados, em comparação com outros grupos (p=0,013).

As características relacionadas ao DM, os exames laboratoriais para detectar o grau de controle da doença e as doenças concomitantes estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Características da história da doença, exames laboratoriais e complicações.

Variáveis	Grupos			p
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Duração do diabetes, anos (Mediana)	---	5,00 ^a	7,50 ^d	<0,001^{†*}
(1° quartil; 3° quartil)		(1,75; 8,50)	(5,00; 15,25)	
HbA1c, % (Média ± DP)	5,58 ± 0,22 ^a	6,29 ± 0,38 ^b	9,08 ± 1,53 ^c	<0,001^{#*}
Glicemia em jejum, mg/dL (Média ± DP)	98,58 ± 9,53 ^a	127,19 ± 26,79 ^d	214,53 ± 72,06 ^c	<0,001^{#*}
Hipertensão (%) (n)	13,16 (5) ^a	77,78 (28) ^b	55,56 (20) ^b	<0,001^{§*}
Depressão/ ansiedade (%) (n)	18,42 (7)	36,11 (13)	19,44 (7)	0,144 [§]
Fibromialgia (%) (n)	2,63 (1)	13,89 (5)	8,33 (3)	0,210 [§]

Dislipidemia (%) (n)	2,63 (1)	16,67 (6)	11,11 (4)	0,127 [§]
Coma hiperosmolar (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	8,33 (3)	0,042 [§]
Disfunção erétil e/ou seca vaginal (%) (n)	13,16 (5)	5,56 (2)	16,67 (6)	0,328 [§]
Obesidade (%) (n)	15,79 (6) ^a	25,00 (9) ^{a,b}	41,67 (15) ^b	0,041^{§*}
Retinopatia (%) (n)	2,63 (1) ^a	22,22 (8) ^b	27,78 (10) ^b	0,011^{§*}
Nefropatia (%) (n)	5,26 (2)	2,78 (1)	8,33 (3)	0,582 [§]
Neuropatia (%) (n)	0,00 (0)	5,56 (2)	8,33 (3)	0,214 [§]
Amputação (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	N/A
Artralgia ou mialgia (%) (n)	5,26 (2)	13,89 (5)	11,11 (4)	0,449 [§]
Disfagia ou dispepsia (%) (n)	0,00 (0)	5,56 (2)	0,00 (0)	0,123 [§]

N/A = não se aplica, ¶ Teste U de Mann-Whitney § Teste Qui-quadrado, # ANOVA a 1 critério com pós teste de Tukey, * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Como esperado, houve diferenças significativas entre os grupos em relação à glicemia em jejum e às taxas de HbA1c ($p < 0,001$). A mediana do tempo desde o diagnóstico de DM2 foi de 5,00 anos no grupo DM2 compensado, e 7,50 no grupo DM2 descompensado ($p < 0,001$), o que sugere que o tempo de evolução do DM teve uma relação significativa com o controle metabólico dos pacientes.

A hipertensão e a retinopatia diabética foram significativamente maiores nos grupos dos diabéticos (compensados e descompensados) em comparação com o controle ($p = 0,011$), enquanto que a prevalência de coma hiperosmolar foi verificada somente no grupo de DM2 descompensados. No parâmetro obesidade, o grupo DM2 descompensados apresentou uma quantidade significativamente mais elevada de indivíduos acometidos, em comparação ao grupo controle ($p = 0,041$). As demais complicações não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

As categorias de medicamentos (classificação ATC) e a quantidade de medicamentos utilizados estão relatados na Tabela 3. Um número total de 45 medicamentos diferentes foi relatado pelos pacientes.

Tabela 3- Quantidade de medicamentos e proporção de categorias de medicamentos utilizados por cada grupo estudado

Variáveis	Grupos			P
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Quantidade de medicamentos (Mediana) (1° quartil; 3° quartil)	0,00 ^a (0,00; 0,00)	4,00 ^b (3,00; 5,00)	3,00 ^b (2,00; 4,00)	<0,001^{†*}
Grupo anatômico principal do sistema de classificação Anatomical Therapeutic Clinical (ATC)				
A-Trato alimentar e metabolismo (%) (n)	5,26 (2) ^a	88,89 (32) ^b	97,22 (35) ^b	<0,001^{§*}
B- Sangue e órgãos hematopoiéticos (%) (n)	0,00 (0) ^a	22,22 (8) ^b	19,44 (7) ^b	0,010^{§*}
C- Sistema cardiovascular (%) (n)	13,16 (5) ^a	75,00 (27) ^b	55,56 (20) ^b	<0,001^{§*}

D- Dermatológicos (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,354 [§]
G- Sistema geniturinário e hormônios sexuais (%) (n)	2,63 (1)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,609 [§]
H- Preparações hormonais para uso sistêmico (%) (n)	0,00 (0) ^a	22,22 (8) ^b	5,56 (2) ^{a,b}	0,003^{§*}
M- Sistema musculoesquelético (%) (n)	2,63 (1)	8,33 (3)	2,78 (1)	0,413 [§]
N- Sistema nervoso (%) (n)	5,26 (2)	19,44 (7)	5,56 (2)	0,070 [§]
S- Órgão dos sentidos (%) (n)	0,00 (0)	5,56 (2)	0,00 (0)	0,123 [§]

† Teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, § Teste *Qui-quadrado*, * $P < 0.05$.
Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O número de medicamentos, assim como os grupos anatômicos A, B e C, apresentaram ser significativamente mais elevados nos grupos de DM2, em comparação com o grupo controle. Porém, no grupo anatômico H, somente o grupo DM2 compensados apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com os outros grupos.

Na tabela 4, verificamos a proporção de medicamentos utilizados por cada grupo estudado, de acordo com grupo principal e subgrupos da classificação ATC.

Tabela 4 - Proporção de categorias de medicamentos utilizados por cada grupo estudado divididos de acordo com grupo principal e subgrupos da classificação ATC.

Grupo anatômico principal do sistema de classificação Anatomical Therapeutic Clinical (ATC)	Classe de medicamentos ATC	Grupo			p [§]
		Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
A-Trato alimentar e metabolismo	Medicamentos para úlcera péptica e doenças de refluxo gastroesofágico (A02BC) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	5,56 (2)	0,341
	Insulinas e análogos (A10AB, A10AC, A10AD, A10AE) (%) (n)	0,00 (0) ^a	2,78 (1) ^a	38,89 (14) ^b	<0,001*
	Hipoglicemiantes orais (A10BA, A10BB, A10BD, A10BH) (%) (n)	0,00 (0) ^a	86,11 (31) ^b	86,11 (31) ^b	<0,001*
	Vitamina D (A11CC) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,354
	Cálcio (A12AA) (%) (n)	5,26 (2)	5,56 (2)	0,00 (0)	0,364
B- Sangue e órgãos hematopoiéticos	Agentes antitrombóticos (B01AC) (%) (n)	0,00 (0) ^a	22,22 (8) ^b	19,44 (7) ^b	0,010*
	Ácido fólico e derivados (B03BB) (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,354
C- Sistema cardiovascular	Diuréticos (de teto baixo), tiazídicos (C03AA) (%) (n)	0,00 (0)	8,33 (3)	8,33 (3)	0,187
	Diuréticos (de teto baixo), excluindo tiazidas (C03BA) (%) (n)	5,26 (2)	22,22 (8)	13,89 (5)	0,104
	Diuréticos (de teto alto) (C03CA) (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,354

	Betabloqueadores (C07AB) (%) (n)	0,00 (0)	13,89 (5)	8,33 (3)	0,068
	Agentes betabloqueadores e outros anti-hipertensivos (C07FA) (%) (n)	0,00 (0)	5,56 (2)	0,00 (0)	0,123
	Bloqueadores seletivos dos canais de cálcio com efeitos principalmente vasculares (C08CA) (%) (n)	2,63 (1)	13,89 (5)	13,89 (5)	0,174
	Inibidores da enzima conversora da angiotensina, monodroga (C09AA) (%) (n)	2,63 (1) ^a	27,78 (10) ^b	22,22 (8) ^b	0,011*
	Inibidores da enzima conversora da angiotensina, associações (C09BA) (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,354
	Antagonistas da angiotensina II, monodroga (C09CA) (%) (n)	7,89 (3) ^{a,b}	27,78 (10) ^b	5,56 (2) ^a	0,010*
	Antagonistas da angiotensina II, associações (C09DB) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,354
	Agentes modificadores de lipídeos, simples (C10AA, C10AB) (%) (n)	2,63 (1)	16,67 (6)	16,67 (6)	0,095
D- Dermatológicos	Antissépticos e desinfetantes (D08AA) (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,354
G- Sistema geniturinário e hormônios sexuais	Estrógenos (G03CA) (%) (n)	2,63 (1)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,384
	Medicamentos utilizados na hiperplasia prostática benigna (G04CA) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,354
H- Preparações hormonais para uso sistêmico	Corticoides para uso sistêmico, monodrogas (H02AB) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,354
	Preparações tireóideas (H03AA) (%) (n)	0,00 (0) ^a	19,44 (7) ^b	5,56 (2) ^{a,b}	0,007*
M- Sistema musculoesquelético	Anti-inflamatórios e antirreumáticos, não esteroidais (M01AC, M01AX) (%) (n)	0,00 (0)	5,56 (2)	2,78 (1)	0,341
	Medicamentos afetando a estrutura óssea e mineralização (M05BA) (%) (n)	2,63 (1)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,609
N- Sistema nervoso	Preparações antieméticas (N02CX) (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	5,56 (2)	0,123
	Antiepiléticos (N03AB, N03AE, N03AF, N03AX) (%) (n)	0,00 (0)	8,33 (3)	0,00 (0)	0,042
	Antipsicóticos (N05AH) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,354
	Ansiolíticos (N05BA) (%) (n)	2,63 (1)	5,56 (2)	0,00 (0)	0,351
	Antidepressivos (N06AA, N06AB) (%) (n)	5,26 (2)	8,33 (3)	0,00 (0)	0,229
S- Órgão dos	Anti-infecciosos (S01AE) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,354

sentidos	Preparações antiglaucoma e mióticos (S01EE) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,354
	Outros oftalmológicos (S01XA) (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	0,00 (0)	0,354

§ Teste Qui-quadrado, * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Como previsto, alguns grupos de medicamentos foram maiores nos pacientes diabéticos (hipoglicemiantes orais, agentes antitrombóticos, inibidores da angiotensina) em relação ao grupo controle; porém o grupo dos DM2 descompensados apresentou significativamente maior quantidade de uso de insulinas em relação ao grupo dos DM2 compensados ($p < 0,001$). O grupo DM2 compensados apresentou significativamente maior quantidade de uso de preparações tireóideas e antagonistas da angiotensina II, quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$).

Sintomas orais associados com o mal funcionamento das glândulas salivares, parâmetros intrabucais e salivares

Os principais sintomas orais associados com alterações do funcionamento das glândulas salivares estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5- Principais sintomas orais associados com alterações do funcionamento de glândulas salivares

Parâmetros	Grupos			p§
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Sede frequente (%) (n)	18,42 (7) ^a	50,00 (18) ^b	33,33 (12) ^{a,b}	0,016*
Dificuldade de mastigar alimentos secos (%) (n)	18,42 (7) ^a	52,78 (19) ^b	38,89 (14) ^{a,b}	0,008*
Dificuldade em falar (%) (n)	10,53 (4)	27,78 (10)	25,00 (9)	0,145
Necessidade de tomar água enquanto come (%) (n)	23,68 (9)	30,56 (11)	36,11 (13)	0,505
Levanta a noite para beber água (%) (n)	28,95 (11)	55,56 (20)	47,22 (17)	0,061
Perda ou alteração do paladar (%) (n)	18,42 (7)	22,22 (8)	30,56 (11)	0,457
Medicamento para tratar boca seca (%) (N)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	N/A
Inchaço das glândulas salivares (%) (n)	5,26 (2)	11,11 (4)	8,33 (3)	0,656
Queixa de boca seca (%) (n)	7,89 (3) ^a	44,44 (16) ^b	41,67 (15) ^b	0,001*
Sintoma leve (%) (n)	7,89 (3) ^a	33,33 (12) ^b	27,78 (10) ^b	0,022*
Sem comprometimento de deglutição e fala (%) (n)	0,00 (0)	5,56 (2)	8,33 (3)	0,214
Com comprometimento de deglutição e fala (%) (n)	0,00 (0)	5,56 (2)	5,56 (2)	0,334
Disfunção severa ou incapacidade para deglutir (%) (n)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	N/A
Ardência bucal na língua (%) (n)	10,53 (4)	11,11 (4)	2,78 (1)	0,352
Ardência bucal na bochecha (%) (n)	0,00 (0)	2,78 (1)	5,56 (2)	0,341
Ardência bucal nos lábios (%) (n)	7,89 (3)	11,11 (4)	16,67 (6)	0,499

N/A = não se aplica, § Teste Qui-quadrado, * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Metade do grupo DM2 compensados relatou que tinha sede e dificuldade frequente em mastigar alimentos secos, em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$). Mais de 40% dos pacientes diabéticos (compensados e descompensados) relataram que sofriam de xerostomia, em comparação com o grupo controle ($p = 0,001$). Entretanto, destes pacientes, a maioria reclamava dos sintomas de forma leve.

Os principais sintomas oculares associados com alterações do funcionamento das glândulas lacrimais estão demonstrados na tabela 6. Sensação de secura nos olhos e irritações oculares foram significativamente mais prevalentes nos indivíduos diabéticos quando comparados ao grupo controle ($p = 0,037$ e $0,018$, respectivamente).

Tabela 6- Principais sintomas oculares associados com alterações do funcionamento de glândulas lacrimais:

Parâmetros	Grupos			p§
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Sensação de secura nos olhos (%) (n)	21,05 (8) ^a	47,22 (17) ^b	44,44 (16) ^b	0,037*
Sensação de areia nos olhos (%) (n)	28,95 (11)	50,00 (18)	44,44 (16)	0,160
Irritações oculares, olhos vermelhos e doloridos (%) (n)	36,84 (14) ^a	69,44 (25) ^b	55,56 (20) ^b	0,018*
Sensação de peso nos olhos ou dificuldade de piscar (%) (n)	15,79 (6)	33,33 (12)	22,22 (8)	0,201
Fotofobia (%) (n)	52,63 (20)	50,00 (18)	41,67 (15)	0,618
Miopia/hipermetropia (%) (n)	68,42 (26)	61,11 (22)	30,56 (11)	0,715
Uso de colírio lubrificante mais de 3x ao dia (%) (n)	5,26 (2)	13,89 (5)	8,33 (3)	0,427

§ Teste Qui-quadrado, * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Não houve diferença estatisticamente significativa para os principais sintomas de alterações de pele (tabela 7).

Tabela 7- Principais sintomas de alterações de pele (xerodermia):

Parâmetros	Grupos			p§
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Ressecamento da pele (%) (n)	36,84 (14)	52,78 (19)	47,22 (17)	0,375
Sensação de coceira ou prurido na pele (%) (n)	10,53 (4)	30,56 (11)	25,00 (9)	0,097
Lesões de pele como fissuras ou manchas vermelhas (%) (n)	7,89 (3)	27,78 (10)	13,89 (5)	0,061

§ Teste Qui-quadrado

Quanto aos principais sintomas de neuropatias distais, os diabéticos apresentaram significativamente maior prevalência na maioria dos parâmetros em relação ao grupo controle.

Somente no quesito alteração do desempenho sexual não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 8).

Tabela 8- Principais sintomas de neuropatias distais:

Parâmetros	Grupos			p§
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Sensação de formigamento ou dormência em alguma parte do corpo (%) (n)	36,84 (14) ^a	69,44 (25) ^b	69,44 (25) ^b	0,004*
Sensação de dor nos membros inferiores (%) (n)	28,95 (11) ^a	77,78 (28) ^b	80,56 (29) ^b	<0,001*
Diminuição ou ausência da transpiração (%) (n)	2,63 (1) ^a	19,44 (7) ^b	30,56 (11) ^b	0,006*
Alteração do desempenho sexual (%) (n)	18,42 (7)	33,33 (12)	33,33 (12)	0,255

§ Teste *Qui-quadrado*, * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os dados da avaliação de secura bucal e dos sintomas subjetivos associados mensurados por escalas analógicas visual (EAV) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Sintomas de secura bucal subjetivos analisados por escala analógica visual (EAV)

EAV	Grupos			p†
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Dificuldade para falar devido à secura (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	0,00 ^a (0,00; 0,00)	0,00 ^b (0,00; 5,00)	0,00 ^b (0,00; 5,00)	0,007*
Dificuldade para engolir devido à secura (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 5,00)	0,00 (0,00; 5,00)	0,176
Quantidade de saliva na boca (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	4,50 (2,25; 5,00)	4,00 (1,75; 5,00)	5,00 (1,75; 7,00)	0,562
Secura na boca (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	0,00 ^a (0,00; 1,50)	0,00 ^a (0,00; 5,25)	4,00 ^b (0,00; 5,25)	0,010*
Secura na garganta (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	0,00 (0,00; 2,50)	0,00 (0,00; 5,25)	0,00 (0,00; 5,00)	0,256
Secura nos lábios (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	3,00 (0,00; 6,00)	5,00 (0,00; 7,00)	3,50 (0,00; 6,00)	0,325
Secura na língua (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 3,00)	0,00 (0,00; 3,25)	0,309
Grau da sede (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	4,00 (0,00; 5,00)	5,00 (3,00; 8,00)	5,00 (2,75; 7,25)	0,347

† Teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

No quesito dificuldade para falar devido à secura, os diabéticos apresentaram significativamente maior prevalência em relação ao grupo controle ($p=0,007$), enquanto que para o quesito secura da boca, o grupo dos DM2 descompensados foi significativamente maior comparado aos demais grupos ($p=0,010$).

As características e parâmetros clínicos intrabucais da amostra estão representados na Tabela 10.

Tabela 10- Características e parâmetros clínicos intrabucais da amostra

Parâmetros clínicos intrabucais	Grupos			P
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Número de dentes (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	22,50 (13,00; 25,75)	13,50 (9,00; 23,00)	16,50 (9,75; 25,25)	0,102 [†]
CPOD médio (Média ± DP)	19,21 ± 6,71	20,67 ± 7,95	19,25 ± 8,71	0,665 [#]
Componentes do CPOD				
Cariados (Média) (%) (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	1,05 (5,47) 0,00 (0,00; 1,00)	0,78 (3,78) 0,00 (0,00; 1,00)	1,19 (6,18) 0,50 (0,00; 2,00)	0,297 [†]
Perdidos (Média) (%) (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	9,5 (49,45) 7,00 (3,00; 16,75)	13,69 (66,26) 12,00 (4,25; 20,75)	12,39 (64,36) 10,00 (3,00; 21,25)	0,220 [†]
Obturados (Média) (%) (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	8,66 (45,08) 9,00 ^a (3,75; 13,00)	6,19 (29,96) 5,00 ^{a,b} (2,00; 9,75)	5,67 (29,45) 4,00 ^b (2,00; 10,00)	0,042 ^{†*}
Desdentados totais (%)	1 (2,63)	4 (11,11)	5 (13,89)	0,212 [§]
IPV (%)	48,09 ± 21,36 ^a	59,47 ± 22,84 ^{a,b}	68,94 ± 21,37 ^b	0,001 ^{#*}
ISS (%)	36,18 ± 17,75 ^a	42,53 ± 19,14 ^{a,b}	52,82 ± 24,37 ^b	0,005 ^{#*}
Sítios com PS ≤ 3 mm (Média ± DP) (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	106,16 ± 43,87 113,00 (71,00; 142,00)	88,84 ± 45,16 76,50 (52,00; 121,50)	81,66 ± 51,37 72,00 (43,00; 118,00)	0,108 [†]
Sítios com PS 4 mm (Média ± DP) (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	8,08 ± 10,55 4,00 (1,00; 10,00)	6,44 ± 6,71 5,00 (1,00; 9,00)	8,50 ± 9,13 5,00 (1,00; 13,25)	0,793 [†]
Sítios com PS 5 a 6 mm (Média ± DP) (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	4,68 ± 6,63 1,00 (0,00; 7,00)	5,03 ± 8,08 2,00 (0,00; 6,50)	11,63 ± 17,31 (2,50) (0,00; 17,00)	0,508 [†]
Sítios com PS ≥ 7 mm (Média ± DP) (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	0,76 ± 1,50 0,00 (0,00; 1,00)	1,13 ± 2,80 0,00 (0,00; 0,00)	4,16 ± 7,96 0,00 (0,00; 0,45)	0,136 [†]

Sítios com PIC ≤ 3 mm (Média ± DP)	108,14 ± 44,91	78,41 ± 48,50	75,09 ± 52,25	
(Mediana)	123,00 ^a	78,00 ^{a,b}	64,50 ^b	0,011^{†*}
(1° quartil, 3° quartil)	(71,00; 142,00)	(36,25; 112,50)	(35,75; 112,25)	
Sítios com PIC 4 mm (Média ± DP)	6,70 ± 8,61	11,72 ± 10,35	11,75 ± 11,94	
(Mediana)	4,00 ^a	9,50 ^b	8,50 ^b	0,014^{†*}
(1° quartil, 3° quartil)	(1,00; 10,00)	(4,75; 17,00)	(3,75; 16,25)	
Sítios com PIC 5 a 6 mm (Média ± DP)	4,05 ± 6,98	7,88 ± 7,12	14,25 ± 16,03	
(Mediana)	(2,00) ^a	(7,00) ^b	(7,00) ^b	0,001^{†*}
(1° quartil, 3° quartil)	(0,00; 5,00)	(1,00; 14,00)	(2,75; 23,75)	
Sítios com PIC ≥ 7 mm (Média ± DP)	0,78 ± 2,56	3,88 ± 9,97	4,84 ± 8,39	
(Mediana)	(0,00) ^a	(0,00) ^a	(3,00) ^b	0,001^{†*}
(1° quartil, 3° quartil)	(0,00; 0,00)	(0,00; 2,00)	(0,00; 6,25)	

† Teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, § Teste *Qui-quadrado*, # *ANOVA* a 1 critério com pós teste de *Tukey*, * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Somente para o componente obturados, o grupo DM2 descompensados apresentou significativamente menor quantidade de dentes obturados quando comparado aos outros grupos ($p=0,042$).

O grupo DM2 descompensados apresentou médias significativamente maiores no IPV e ISS do que os outros grupos ($p=0,001$ e $p=0,005$, respectivamente).

Profundidades de sondagem e perdas de inserção clínica foram categorizadas como ≤ 3 mm, 4 mm, 5 a 6 mm e ≥ 7 mm. Dentes com PS ≥ 5 mm ou PIC ≥ 5 milímetros foram utilizados como indicadores de atividade da doença periodontal e extensão. Os parâmetros clínicos de PS não mostraram diferença entre os grupos. Porém, sítios com PIC ≤ 3 mm foram significativamente menores no grupo com DM2 descompensados ($p=0,011$), enquanto que os sítios com PIC 4 e 5 a 6 mm foram significativamente mais elevados em ambos os grupos diabéticos em comparação com o grupo controle ($p=0,014$ e $p=0,001$, respectivamente). Indivíduos com DM2 descompensados tiveram significativamente maior quantidade de sítios com PIC ≥ 7 mm do que os grupos controle e DM2 compensados ($p=0,001$) (Tabela 10).

No grupo DM2 compensados, a duração do diabetes foi positivamente correlacionada com o índice CPOD ($r=0,485$, $p=0,005$) e idade ($r=0,431$, $p=0,014$). No mesmo grupo, a duração do diabetes foi correlacionada negativamente com o número de dentes ($r=-0,502$, $p=0,003$), PS ≤ 3mm ($r=-0,427$, $p=0,015$) e PIC ≤ 3 mm ($r=-0,410$, $p=0,020$).

Os resultados referentes aos fluxos salivares e à capacidade tampão da saliva estão demonstrados na tabela 11.

Tabela 11- Taxas dos fluxos salivares e capacidade tampão da saliva.

Variáveis	Grupos			p
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Taxa de fluxo STR (g/min) (Média ± DP)	0,35 ± 0,22	0,21 ± 0,17	0,19 ± 0,16	0,001^{†*}
(Mediana)	(0,30) ^a	(0,16) ^b	(0,17) ^b	
(1° quartil, 3° quartil)	(0,17; 0,51)	(0,10; 0,27)	(0,07; 0,27)	
Taxa de fluxo STR (mL/min) (Média ± DP)	0,34 ± 0,22	0,21 ± 0,17	0,19 ± 0,17	0,002^{†*}
(Mediana)	(0,30) ^a	(0,16) ^b	(0,13) ^b	
(1° quartil, 3° quartil)	(0,16; 0,46)	(0,08; 0,28)	(0,06; 0,27)	
Taxa de fluxo STE (g/min) (Média ± DP)	1,26 ± 0,75	0,91 ± 0,46	0,86 ± 0,53	0,014^{†*}
(Mediana)	(1,10) ^a	(0,80) ^b	(0,70) ^b	
(1° quartil, 3° quartil)	(0,91; 1,48)	(0,55; 1,13)	(0,52; 1,25)	
Taxa de fluxo STE (mL/min) (Média ± DP)	1,24 ± 0,76	0,87 ± 0,42	0,86 ± 0,53	0,026^{†*}
(Mediana)	1,07 ^a	0,88 ^{a,b}	0,72 ^b	
(1° quartil, 3° quartil)	(0,84; 1,46)	(0,52; 1,11)	(0,52; 1,22)	
Taxa de fluxo SLS (µL/cm ² /min) (Média ± DP)	5,48 ± 3,91	3,84 ± 2,28	4,67 ± 4,27	0,027^{†*}
(Mediana)	4,37 ^a	3,80 ^b	3,52 ^b	
(1° quartil, 3° quartil)	(3,01; 7,09)	(2,27; 4,52)	(1,97; 5,35)	
Porcentagem da taxa de fluxo STR <0,1 g/min (n)	7,89% (3) ^a	27,78% (10) ^{a,b}	33,3% (12) ^b	0,022^{†*}
Porcentagem da taxa de fluxo STE <0,7 g/min (n)	15,79% (6) ^a	36,11% (13) ^{a,b}	50,00% (18) ^b	0,007^{†*}
Porcentagem da taxa de fluxo STR <0,1 mL/min (n)	5,26% (2) ^a	27,78% (10) ^b	30,56% (11) ^b	0,013^{§*}
Porcentagem da taxa de fluxo STE <0,7 mL/min (n)	18,42% (7) ^a	36,11% (13) ^{a,b}	47,22% (17) ^b	0,030^{§*}
Porcentagem da taxa de fluxo SLS <3,94 µL/cm ² /min (n)	42,11% (16)	55,56% (20)	52,78% (19)	0,472 [§]
Porcentagem concomitante de hipossalivação da STR e STE (n)	5,26% (2)	16,67% (6)	19,44% (7)	0,167 [§]
Porcentagem concomitante de hipossalivação da STR, STE e SLS (n)	5,26% (2)	8,33% (3)	11,11% (4)	0,656 [§]
Capacidade tampão (Média ± DP)	3,46 ± 1,21	4,18 ± 1,21	4,24 ± 1,27	0,009^{†*}
(Mediana)	(3,00) ^a	(4,25) ^b	(4,75) ^b	
(1° quartil, 3° quartil)	(2,55; 4,00)	(3,00; 5,00)	(3,00; 5,00)	

† Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, § Teste Qui-quadrado, * P<0,05.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

As sialometrias realizadas tanto em repouso quanto estimulada, foram pesadas e pipetadas para confirmar a medida de 1g correspondendo a 1ml, assumindo-se a gravidade igual a 1g/cm³. O teste de correlação de Pearson foi estatisticamente significativo (r=0,972, p=0,000) para as variáveis volume saliva em repouso (mL/min) e peso saliva repouso (g/min), e a análise de repetibilidade resultou em ICC=0,986, indicando uma excelente repetibilidade entre as análises. Para as variáveis de volume saliva estimulada (mL/min) e peso saliva estimulada (g/min), o coeficiente de correlação de Pearson também foi estatisticamente significativo (r=0,991, p=0,000) e ICC=0,995, indicando que é

compatível adotarmos também a medida gravimétrica. Desta forma, exclui-se o problema da espuma salivar, que dificulta a mensuração do seu volume.

Ambas as taxas de fluxo STR e SLS foram significativamente menores nos grupos de diabéticos em comparação com o grupo controle ($p=0,002$ e $p=0,027$, respectivamente). A taxa de fluxo STE no grupo DM2 descompensados foi significativamente menor entre os grupos ($p=0,026$). A percentagem de indivíduos com a taxa de fluxo STR $<0,1$ ml/min foi maior no grupo de diabéticos, o que indica que ambos os grupos, independentemente do controle metabólico, apresentaram hipossalivação ($p=0,013$), ao passo que a percentagem de indivíduos com a taxa de fluxo STE $<0,7$ ml/min no grupo DM2 descompensados foi a mais elevada entre todos os grupos ($p=0,030$). Uma diferença significativa também foi encontrada entre os diabéticos (compensados e descompensados) e o grupo controle no quesito capacidade tampão da saliva ($p=0,009$).

As taxas de fluxo STR e STE foram positivamente correlacionadas no grupo de controle ($r=0,664$, $p<0,001$), no grupo DM2 compensados ($r=0,580$, $p<0,001$), e no grupo com DM2 descompensados ($r=0,741$, $p<0,001$). No entanto, não foram encontradas correlações significativas entre a taxa de fluxo SLS e as outras taxas de fluxos salivares.

Quanto às correlações entre as taxas de fluxos salivares estudados, uma correlação negativa entre HbA1c e a taxa de fluxo STR no grupo controle ($r= -0,366$, $p=0,024$) e uma correlação positiva entre a idade e a taxa de fluxo STR no grupo DM2 compensados ($r=0,493$, $p=0,002$) foram encontrados. No grupo de DM2 compensados, uma correlação positiva entre a duração do diabetes e idade ($r=0,381$, $p=0,022$) foi verificada. Não foram encontradas correlações significativas entre as taxas de fluxos salivares e número de medicamentos nos grupos analisados, nem entre as taxas de fluxos salivares e a duração do diabetes. Além disso, não foi observada diferença significativa alguma na comparação das taxas de fluxos salivares de acordo com a presença de hipertensão, obesidade, nefropatia e retinopatia ($p> 0,05$). No grupo DM2 descompensados, a capacidade tampão da saliva foi positivamente correlacionada com o índice de placa visível ($r=0,468$, $p=0,008$).

O número de medicamentos prescritos foi associado com as taxas de fluxos salivares STR, STE e SLS, conforme demonstrado na tabela 12. Não foi encontrado diferença estatisticamente significante entre os grupos estudados para nenhum tipo de fluxo salivar. Porém, é possível verificar que os pacientes DM2 descompensados que tomam mais de 6 medicamentos por dia apresentaram média dos fluxos salivares bem inferiores aos demais grupos, entrando na faixa de hipossalivação para STR, STE e SLS. Entretanto, esses dados devem ser analisados com cautela uma vez que somente dois pacientes DM2 descompensados foram incluídos nesse parâmetro.

O efeito dos tipos de medicamentos de acordo com a classificação ATC nas taxas de hipossalivação podem ser vistos nos apêndices D, E e F. Nos apêndices D e E, verificou-se que nenhum medicamento foi associado com a taxa de hipossalivação da STR e STE entre os grupos estudados. Já em relação à taxa de hipossalivação da SLS (apêndice F), verificou-se uma associação significativa com o uso de insulinas e análogos no grupo DM2 descompensados ($p=0,015$; OR=2,19; IC: 1,53 - 3,14).

Tabela 12- Taxas dos fluxos salivares STR, STE e SLS associados com o número de medicamentos utilizados pelos participantes. As taxas de fluxos (ml/min) são demonstradas em valores de médias e desvio padrão (mediana)

No. de medicamentos	Taxa do fluxo salivar em repouso (ml/min)			p	Taxa do fluxo salivar estimulada (ml/min)			p	Taxa fluxo salivar das glândulas salivares menores (lábio superior)			p
	Grupos				Grupos				Grupos			
	Controle (n)	DM tipo 2 compensados (n)	DM tipo 2 descompensados (n)		Controle (n)	DM tipo 2 compensados (n)	DM tipo 2 descompensados (n)		Controle (n)	DM tipo 2 compensados (n)	DM tipo 2 descompensados (n)	
0	0,36 ± 0,04 (29)	----	----	N/A	1,34 ± 0,16 (29)	----	----	N/A	5,59 ± 0,76 (29)	----	----	N/A
1	0,32 ± 0,08 (4)	0,15 ± 0,05 (6)	0,15 ± 0,04 (10)	0,095 [#]	0,99 ± 0,15 (4)	0,70 ± 0,15 (6)	0,95 ± 0,18 (10)	0,555 [#]	5,01 ± 2,23 (4)	4,79 ± 1,39 (6)	7,35 ± 2,08 (10)	0,607 [#]
2 + 3	0,24 ± 0,05 (5)	0,24 ± 0,05 (15)	0,23 ± 0,05 (18)	0,985 [#]	0,90 ± 0,14 (5)	0,94 ± 0,13 (15)	0,82 ± 0,11 (18)	0,765 [#]	5,23 ± 1,21 (5)	3,26 ± 0,40 (15)	3,60 ± 0,63 (18)	0,262 [#]
4 + 5	----	0,24 ± 0,06 (11)	0,17 ± 0,07 (6)	0,516 [*]	----	1,04 ± 0,15 (11)	1,06 ± 0,21 (6)	0,919 [*]	----	4,48 ± 0,76 (11)	4,51 ± 0,65 (6)	0,984 [*]
6 +	----	0,18 ± 0,08 (4)	0,05 ± 0,05 (2)	0,355 [*]	----	0,73 ± 0,16 (4)	0,11 ± 0,05 (2)	0,063 [*]	----	2,79 ± 0,56 (4)	1,45 ± 0,42 (2)	0,201 [*]

N/A = não se aplica, # ANOVA a 1 critério, * Teste t de Student

Concentração das CgA salivar e plasmática, e suas associações com os parâmetros clínicos

Tanto a concentração da CgA salivar quanto da CgA plasmática foram significativamente maiores nos grupos dos diabéticos, independente do controle glicêmico, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$ e $P = 0,019$, respectivamente) (Figura 16 e 17). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a produção de CgA salivar (pmol/min) (Vide tabela 13).

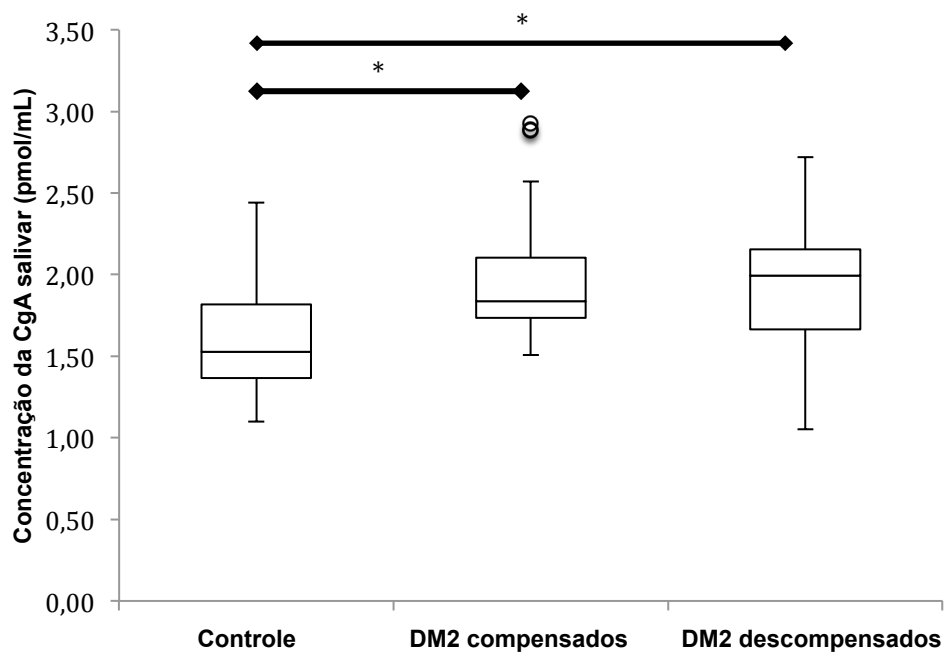


Figura 16 - Concentração da Cromogranina A salivar (pmol/mL) nos diferentes grupos estudados (teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de comparação múltipla de *Dunn*, $P < 0,001$).

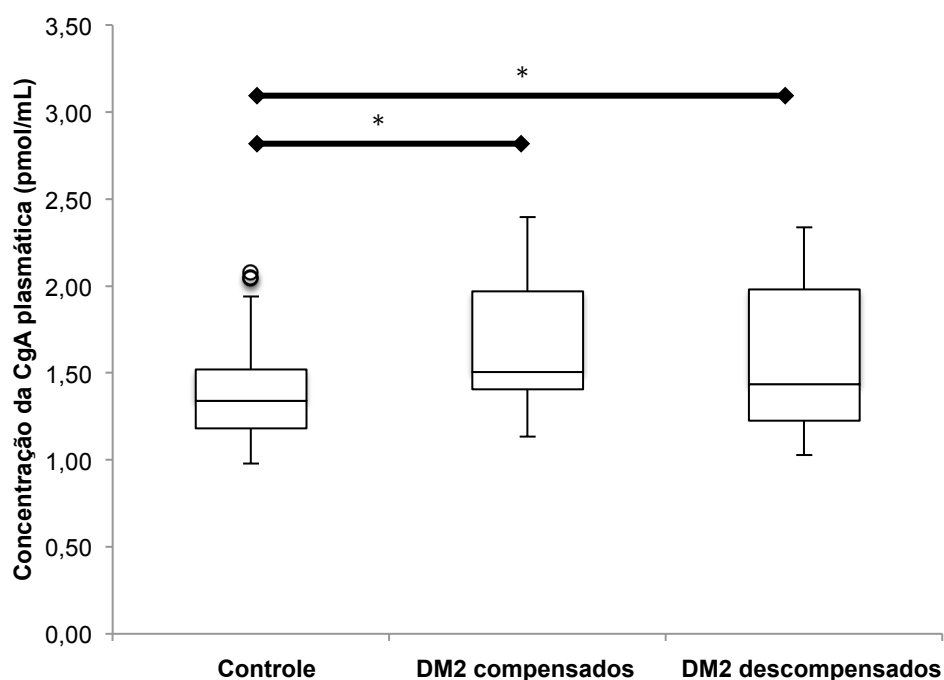


Figura 17 - Concentração da Cromogranina A plasmática (pmol/mL) nos diferentes grupos estudados (teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de comparação múltipla de *Dunn*, $p=0,019$).

Tabela 13- Comparação entre as concentrações de CgA (saliva e plasma) e produção de CgA salivar entre os grupos.

Parâmetros	Grupos			p
	Controle	DM tipo 2 compensados	DM tipo 2 descompensados	
Concentração CgA salivar (pmol/mL) (Média ± DP)	1,62 ± 0,34	1,97 ± 0,38	1,89 ± 0,44	<0,001 ^{†*}
(Mediana)	1,53 ^a	1,84 ^b	1,99 ^b	
(1º quartil, 3º quartil)	(1,37; 1,82)	(1,73; 2,10)	(1,67; 2,16)	
Produção CgA salivar (pmol/min) (Média ± DP)	1,91 ± 1,01	1,76 ± 0,95	1,56 ± 0,99	0,271 [†]
(Mediana)	1,60	1,62	1,28	
(1º quartil, 3º quartil)	(1,37; 2,08)	(1,01; 2,22)	(0,79; 2,13)	
Concentração CgA plasmática (pmol/mL) (Média ± DP)	1,41 ± 0,31	1,63 ± 0,35	1,62 ± 0,45	0,019 ^{†*}
(Mediana)	1,34 ^a	1,50 ^b	1,44 ^b	
(1º quartil, 3º quartil)	(1,18; 1,52)	(1,41; 1,97)	(1,22; 1,98)	

[†] Teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, * $P<0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

No grupo controle, a concentração de CgA salivar foi negativamente correlacionada com a taxa de fluxo STE ($r= -0,415$, $p= 0,010$) e positivamente correlacionada com o número de medicamentos ($r= 0,366$, $p= 0,024$). Entretanto, correlações semelhantes não foram observadas em pacientes com DM2.

Após a comparação entre os grupos de acordo com a presença de xerostomia, os seguintes dados foram observados: uma menor taxa de fluxo STR ($P=0,011$) e uma maior frequência de idade, número de medicamentos e concentração de CgA salivar ($p=0,011$; $p=0,003$ e $p<0,001$, respectivamente) foram encontradas nos grupos diabéticos sem xerostomia comparado ao grupo controle. O grupo de diabéticos com xerostomia revelou uma quantidade de medicamentos maior do que o grupo controle ($P=0,020$) (Tabela 14).

Tabela 14 – Comparação entre os fluxos salivares, idade, número de medicamentos e concentração da CgA salivar (pmol/mL) de acordo com a presença de xerostomia.

Parâmetros	Ausência de xerostomia			p †	Presença de xerostomia			p †
	Controle Mediana (1° quartil, 3° quartil)	DM tipo 2 compensados Mediana (1° quartil, 3° quartil)	DM tipo 2 descompensados Mediana (1° quartil, 3° quartil)		Controle Mediana (1° quartil, 3° quartil)	DM tipo 2 compensados Mediana (1° quartil, 3° quartil)	DM tipo 2 descompensados Mediana (1° quartil, 3° quartil)	
Taxa de fluxo STR, mL/min	0,30 ^a (0,16; 0,46)	0,17 ^b (0,11; 0,28)	0,10 ^b (0,06; 0,30)	0,011*	0,38 (0,18; 0,74)	0,13 (0,07; 0,29)	0,18 (0,10; 0,26)	0,281
Taxa de fluxo STE, mL/min	1,06 (0,82; 1,48)	0,98 (0,74; 1,24)	0,70 (0,50; 1,20)	0,158	1,08 (0,76; 3,62)	0,61 (0,44; 1,08)	0,74 (0,52; 1,34)	0,428
Taxa de fluxo SLS, $\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$	4,33 (2,73; 7,23)	4,08 (2,30; 4,50)	4,30 (3,10; 5,10)	0,370	5,20 (4,33; 7,97)	3,00 (2,15; 4,60)	2,67 (1,70; 6,73)	0,243
Idade, anos	51 ^a (49; 55)	59 ^b (51; 63)	57 ^b (48; 64)	0,011*	57 (50; 64)	55 (52; 60)	52 (47; 63)	0,954
Número de medicamentos	0,00 ^a (0,00; 0,00)	4,00 ^b (3,00; 5,50)	3,00 ^b (1,00; 5,00)	0,003*	2,00 ^a (0,00; 2,00)	3,00 ^b (2,00; 5,00)	3,00 ^b (2,00; 4,00)	0,020*
Concentração de CgA salivar, pmol/mL	1,52 ^a (1,36; 1,82)	1,78 ^b (1,70; 1,94)	2,07 ^b (1,90; 2,26)	<0,001*	1,55 (1,10; 2,44)	1,93 (1,80; 2,30)	1,81 (1,24; 2,01)	0,130

† Teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, * $P<0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

As concentrações de CgA plasmática e CgA salivar foram correlacionadas com os parâmetros clínicos em toda a amostra, combinando todos os grupos. Entre esses parâmetros, os níveis salivares e plasmáticos de CgA foram negativamente correlacionados com PIC ≤ 3 mm ($r = -0,265$, $p = 0,008$ e $r = -0,295$, $p = 0,003$, respectivamente) e positivamente correlacionados com a PIC 4 mm ($r = 0,344$, $p < 0,001$ e $r = 0,372$, $p < 0,001$, respectivamente) e PIC 5 a 6 mm ($r = 0,207$, $p = 0,038$ e $r = 0,231$, $p = 0,021$). Além disso, os níveis de CgA salivares foram positivamente correlacionados com o IMC ($r = 0,268$, $p = 0,007$), índice de placa visível ($r = 0,330$, $p = 0,001$), capacidade tampão ($r = 0,404$, $p < 0,001$) e níveis de CgA plasmática ($r = 0,406$, $p < 0,001$), enquanto os níveis de CgA plasmática foram positivamente correlacionados com a idade ($r = 0,338$, $p = 0,001$) e duração do diabetes ($r = 0,231$, $p = 0,021$).

Quando avaliados separadamente no grupo controle, não houve correlação significativa entre a concentração de CgA salivar e os parâmetros clínicos e periodontais, mas a concentração de CgA plasmática foi positivamente correlacionada com ISS ($r= 0,337$, $p= 0,041$). A concentração de CgA salivar foi positivamente correlacionada com a concentração de CgA plasmática ($r= 0,443$, $p= 0,006$); entretanto, correlações semelhantes não foram observados em pacientes com DM2.

No grupo DM2 compensados, não houve correlação significativa entre a concentração de CgA plasmática e salivar e os parâmetros clínicos e periodontais.

No grupo DM2 descompensados, a concentração salivar de CgA foi positivamente correlacionada com o IMC ($r= 0,457$, $p= 0,01$), índice de placa visível ($r= 0,452$, $p= 0,011$), PIC 4 mm ($r= 0,441$, $p= 0,013$) e a capacidade tampão ($r= 0,533$, $p= 0,002$). No que se refere à concentração CgA plasmática, uma correlação positiva com o índice CPOD ($r= 0,430$, $p= 0,016$) e uma negativa com PIC ≤ 3 mm ($r= -0,370$, $p= 0,040$) e PIC = 4 mm ($r= 0,392$, $p= 0,029$) foram encontradas.

Para verificar a concentração de CgA de acordo com os parâmetros periodontais, as concentrações medianas de CgA plasmática e CgA salivar foram associadas com valores de PS e PIC, e estão descritos na Tabela 15. Os indivíduos do estudo foram distribuídos de acordo com cada grupo e também pelo número de indivíduos, que foram estratificados conforme a presença de um ou mais sítios com o pior parâmetro periodontal. No parâmetro PS 5 a 6 mm verificou-se que ambos os grupos diabéticos tiveram níveis de CgA salivar significativamente maiores do que o grupo controle ($p= 0,010$). Da mesma forma, quando o PIC 5 a 6 mm é comparado entre os grupos, uma concentração significativamente maior de CgA salivar em ambos os grupos diabéticos foi observada ($p= 0,001$). Não houve diferença significativa para os parâmetros da situação periodontal e a concentração de CgA plasmática.

Tabela 15 – Comparação das concentrações de CgA salivar e plasmática de acordo com o PS e PIC entre os grupos.

Parâmetros	Grupos (n*)	CgA Salivar Mediana (1° quartil, 3° quartil)	p†	CgA Plasmática Mediana (1° quartil, 3° quartil)	p†
PS ≤ 3 mm	Controle (n=3)	1,66 (1,36; 2,03)	0,390	1,16 (1,09; 1,31)	0,046
	DM2 compensados (n=4)	1,88 (1,78; 2,42)		1,47 (1,32; 1,77)	
	DM2 descompensados (n=2)	2,17 (1,90; 2,44)		2,10 (2,09; 2,12)	
PS 4 mm	Controle (n=10)	1,46 (1,30; 1,89)	0,190	1,21 (1,07; 1,75)	0,132
	DM2 compensados (n=5)	1,83 (1,81; 2,12)		1,77 (1,68; 2,10)	
	DM2 descompensados (n=8)	1,96 (1,61; 2,01)		1,91 (1,17; 2,13)	
PS 5 a 6 mm	Controle (n=13)	1,53 ^a (1,42; 1,72)	0,010*	1,29 (1,24; 1,49)	0,463
	DM2 compensados (n=16)	1,86 ^b (1,70; 2,03)		1,45 (1,26; 1,73)	
	DM2 descompensados (n=8)	2,11 ^b (1,50; 2,18)		1,42 (1,24; 1,75)	
PS ≥ 7 mm	Controle (n=11)	1,51 (1,36; 2,12)	0,417	1,44 (1,28; 1,73)	0,830
	DM2 compensados (n=7)	1,72 (1,61; 1,75)		1,45 (1,22; 1,99)	
	DM2 descompensados (n=13)	2,05 (1,42; 2,07)		1,36 (1,21; 1,76)	
PIC ≤ 3 mm	Controle (n=3)	1,66 (1,36; 2,03)	0,279	1,16 (1,09; 1,31)	0,102
	DM2 compensados (n=3)	1,72 (1,67; 1,81)		1,47 (1,43; 1,68)	
	DM2 descompensados (n=1)	1,25 (1,25; 1,25)		1,44 (1,44; 1,44)	
PIC 4 mm	Controle (n=11)	1,46 (1,30; 1,89)	0,128	1,22 (1,07; 1,75)	0,459
	DM2 compensados (n=3)	2,88 (1,59; 2,93)		1,45 (1,21; 2,30)	
	DM2 descompensados (n=3)	1,41 (1,17; 2,09)		1,26 (1,26; 1,90)	
PIC 5 a 6 mm	Controle (n=14)	1,53 ^a (1,42; 1,72)	0,001*	1,33 (1,24; 1,49)	0,091
	DM2 compensados (n=15)	1,91 ^b (1,79; 2,10)		1,52 (1,44; 1,77)	

	DM2 descompensados (n=8)	1,96 ^b (1,78; 2,17)		1,48 (1,30; 1,94)	
	Controle (n=9)	1,51 (1,36; 2,12)		1,46 (1,38; 1,73)	
PIC ≥ 7 mm	DM2 compensados (n=11)	1,76 (1,65; 1,85)	0,247	1,28 (1,23; 2,04)	0,882
	DM2 descompensados (n=19)	2,05 (1,78; 2,17)		1,43 (1,18; 2,24)	

‡ número de pacientes com pelo menos um sítio com a pior condição periodontal (PS ou PIC)

† Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Freqüências genótípicas para T-415C e Glu264Asp e sua influência nas taxas de fluxo de salivares e concentração da CgA.

A distribuição dos genótipos e alelos dos polimorfismos da CgA não diferiu significativamente entre os grupos controle e diabéticos (vide tabela 16). É interessante notar que não houve genótipo GG no grupo controle para o polimorfismo Glu264Asp.

Tabela 16 – Distribuição dos genótipos e frequência dos alelos dos polimorfismos da CgA (T-415C e Glu264Asp) entre os grupos.

		Controle (n) (%)	DM2 Compensados (n) (%)	DM2 descompensados (n) (%)	p[§]
T-415C					
Genótipo	CC	13 (34,21)	11 (30,56)	13 (36,11)	0,951
	CT	19 (50,00)	17 (47,22)	17 (47,22)	
	TT	6 (15,79)	8 (22,22)	6 (16,67)	
	Total	38 (100,00)	36 (100,00)	36 (100,00)	
Alelos	C	45 (59,21)	39 (54,17)	43 (46,74)	0,264
	T	31 (40,79)	33 (45,83)	49 (53,21)	
	Total	76 (100,00)	72 (100,00)	72 (100,00)	
Glu264Asp					
Genótipo	CC	17 (44,74)	13 (36,11)	17 (47,22)	0,536
	GC	21 (55,26)	21 (58,33)	17 (47,22)	
	GG	-	2 (5,56)	2 (5,56)	
	Total	38 (100,00)	36 (100,00)	36 (100,00)	
Alelos	C	55 (72,37)	47 (65,28)	51 (70,83)	0,618
	G	21 (27,63)	25 (34,72)	21 (29,17)	
	Total	76 (100,00)	72 (100,00)	72 (100,00)	

§ Qui-quadrado

Para verificar a produção de CgA de acordo com os genótipos e os alelos, as concentrações de CgA plasmática e CgA salivar foram comparadas, tendo como referencial os polimorfismos T-415C e Glu264Asp. Tais comparações estão descritas na Tabela 17. A análise de polimorfismo rs9658635 (T-415C) na região promotora do CgA mostrou que ambos os grupos de diabéticos com o genótipo homocigoto CC tiveram uma concentração de CgA salivar significativamente maior que o grupo controle ($p = 0,008$). Da mesma forma, quando a influência do alelo C é comparada entre os

grupos, uma maior concentração de CgA salivar nos grupos dos diabéticos foi observada ($p= 0,005$). Além disso, no que tange o polimorfismo da CgA rs9658655 (Glu264Asp), verificou-se uma concentração significativamente maior de CgA salivar nos grupos DM2 compensados e descompensados com o genótipo CC ($p= 0,042$), em comparação com o grupo controle. Do mesmo modo, a presença do alelo C revelou um aumento significativo da concentração de CgA salivar nos grupos diabéticos, em comparação com o grupo controle ($p= 0,001$).

Comparações dos polimorfismos da CgA com os fluxos salivares também foram feitas (vide Tabela 18) e observou-se diferenças significativas entre o alelo C do polimorfismo da CgA T-415C e menores taxas de fluxo STR nos grupos dos diabéticos, em comparação com o controle ($p= 0,006$). Além disso, para o alelo C no éxon 6 da CgA, menores valores de fluxos STR também foram observadas no grupo de diabéticos ($p= 0,002$). Por outro lado, para o genótipo TT (polimorfismo T-415C), as taxas de fluxos STR e STE foram significativamente menores no DM2 descompensados do que no grupo controle ($p= 0,044$ e $p= 0,006$, respectivamente). Não houve diferença significativa para a taxa de fluxo SLS.

Tabela 17 – Comparação entre os polimorfismos da CgA e a concentração da CgA salivar e plasmática (pmol/mL)

Polimorfismos Genótipo/ Alelo	Concentração da CgA salivar (pmol/mL)			p	Concentração da CgA plasmática (pmol/mL)			p
	Controle (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 compensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 descompensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)		Controle (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 compensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 descompensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	
T-415C								
CC	1,36 ^a (1,30; 1,52)	1,80 ^b (1,76; 1,88)	1,86 ^b (1,41; 2,01)	0,008 ^{†*}	1,38 (1,11; 1,89)	1,59 (1,24; 1,97)	1,20 (1,00; 1,93)	0,613 [†]
CT	1,53 (1,42; 1,97)	1,83 (1,72; 1,99)	1,93 (1,48; 2,09)	0,204 [†]	1,29 (1,22; 1,68)	1,62 (1,20; 2,12)	1,51 (1,22; 2,00)	0,539 [†]
TT	1,68 (1,55; 2,03)	2,38 (1,73; 2,73)	2,22 (2,18; 2,56)	0,083 [†]	1,13 (1,07; 1,19)	1,63 (1,34; 1,86)	1,53 (1,00; 1,76)	0,548 [†]
C	1,48 ^a (1,34; 1,82)	1,81 ^b (1,73; 1,95)	1,89 ^b (1,42; 2,07)	0,005 ^{†*}	1,35 (1,20; 1,68)	1,59 (1,24; 1,98)	1,44 (1,00; 1,97)	0,445 [†]
Glu264Asp								
CC	1,46 ^a (1,36; 1,79)	1,81 ^b (1,76; 1,95)	1,88 ^b (1,41; 2,12)	0,042 ^{†*}	1,32 (1,11; 1,68)	1,73 (1,24; 1,97)	1,46 (1,00; 2,00)	0,373 [†]
GC	1,55 ^a (1,40; 1,82)	1,84 ^b (1,74; 2,10)	2,07 ^b (1,98; 2,18)	0,006 ^{†*}	1,28 (1,16; 1,58)	1,46 (1,23; 1,85)	1,31 (1,00; 1,96)	0,685 [†]
GG	-	2,32 (1,72; 2,93)	1,77 (1,75; 1,78)	0,999 [¶]	-	2,02 (1,79; 2,24)	1,26 (1,00; 1,52)	0,333 [¶]
C	1,53 ^a (1,36; 1,82)	1,84 ^b (1,74; 2,10)	2,01 ^b (1,48; 2,17)	0,001 ^{†*}	1,29 (1,15; 1,68)	1,49 (1,24; 1,92)	1,46 (1,00; 1,97)	0,412 [†]

† Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, ¶ Teste U de Mann-Whitney * P<0,05.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Tabela 18 – Comparação entre os polimorfismos da CgA e os fluxos salivares (STR, STE e SLS)

Polimorfismos Genótipo/ Alelo	Taxa de fluxo salivar STR (mL/min)				Taxa de fluxo salivar STE (mL/min)				Taxa de fluxo salivar SLS ($\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$)			
	Controle (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 compensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 descompensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	p	Controle (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 compensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 descompensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	p	Controle (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 compensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	DM2 descompensados (Mediana) (1° quartil, 3° quartil)	p
T-415C												
CC	0,30 (0,16; 0,54)	0,22 (0,12; 0,36)	0,24 (0,10; 0,30)	0,208 [†]	1,06 (1,02; 1,52)	1,08 (0,96; 1,30)	1,02 (0,66; 1,12)	0,334 [†]	4,07 (2,33; 6,33)	2,97 (1,87; 4,33)	3,10 (1,77; 5,10)	0,537 [†]
CT	0,30 ^a (0,16; 0,46)	0,12 ^b (0,08; 0,18)	0,12 ^b (0,08; 0,34)	0,019^{†*}	1,08 (0,68; 1,30)	0,74 (0,44; 1,02)	0,60 (0,42; 1,40)	0,252 [†]	4,40 (2,73; 9,57)	3,30 (2,27; 4,67)	4,00 (2,00; 5,00)	0,212 [†]
TT	0,28 ^a (0,12; 0,40)	0,22 ^a (0,11; 0,41)	0,05 ^b (0,02; 0,10)	0,044^{†*}	0,95 ^a (0,76; 1,20)	0,75 ^{a,b} (0,61; 0,90)	0,56 ^b (0,30; 0,70)	0,006^{†*}	5,13 (3,03; 6,00)	4,17 (3,07; 4,90)	4,03 (3,07; 7,27)	0,763 [†]
C	0,30 ^a (0,16; 0,49)	0,15 ^b (0,08; 0,25)	0,18 ^b (0,10; 0,30)	0,006^{†*}	1,07 (0,93; 1,50)	0,99 (0,49; 1,24)	0,85 (0,52; 1,34)	0,142 [†]	4,37 (2,72; 7,67)	3,13 (2,17; 4,50)	3,52 (1,87; 5,10)	0,130 [†]
Glu264A												
sp	0,36 (0,18; 0,52)	0,22 (0,12; 0,36)	0,24 (0,08; 0,30)	0,129 [†]	1,06 (1,00; 1,48)	1,02 (0,74; 1,20)	0,84 (0,42; 1,26)	0,162 [†]	5,00 (2,70; 8,67)	4,27 (2,33; 5,33)	3,53 (2,67; 6,73)	0,595 [†]
CC	0,24 ^a (0,14; 0,42)	0,12 ^b (0,08; 0,22)	0,10 ^b (0,06; 0,24)	0,012^{†*}	1,08 (0,70; 1,30)	0,74 (0,48; 1,08)	0,63 (0,52; 1,08)	0,114 [†]	4,33 (3,03; 6,33)	2,97 (2,27; 4,33)	3,50 (1,87; 4,87)	0,110 [†]
GC	-	0,20 (0,18; 0,22)	0,17 (0,00; 0,34)	0,999 [¶]	-	1,01 (1,00; 1,02)	1,23 (0,74; 1,72)	0,999 [¶]	-	3,10 (2,13; 4,07)	3,88 (2,77; 5,00)	0,999 [¶]
GG												
C	0,30 ^a (0,16; 0,46)	0,15 ^b (0,08; 0,28)	0,13 ^b (0,06; 0,26)	0,002^{†*}	1,07 ^a (0,82; 1,48)	0,78 ^b (0,50; 1,20)	0,68 ^b (0,50; 1,20)	0,021^{†*}	4,37 (3,00; 7,23)	3,62 (2,27; 4,67)	3,52 (1,87; 6,10)	0,120 [†]

† Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, ¶ Teste U de Mann-Whitney * $P < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos.

6. *Discussão*

6. DISCUSSÃO

Na prática clínica, a CgA é rotineiramente usada como um marcador diagnóstico de cânceres e doenças neurodegenerativas (44). Escassas informações são encontradas na literatura sobre o papel da CgA no DM2. Um estudo anterior mostrou uma superexpressão de CgA na saliva de pacientes com DM2 e seu potencial como um biomarcador não invasivo para esta doença; todavia, este estudo avaliou uma amostra de 30 pacientes DM2, não diferenciando o status de controle glicêmico dos mesmos (45). O presente estudo demonstrou que os níveis elevados de CgA plasmática e salivar foram associados a pacientes com DM2 independentemente do controle glicêmico, o que reforça as conclusões do estudo anterior (45).

Além disso, também verificou-se em um estudo anterior que os níveis salivares de CgA nos indivíduos estudados estão intimamente relacionados com os níveis plasmáticos, confirmando que a CgA pode atravessar os vasos sanguíneos e adentrar as células glandulares (162). Esta observação sugere que tanto a CgA salivar quanto a CgA circulante podem ser usadas para a aplicação clínica como marcadores complementares. Ademais, estudos recentes analisaram a hipótese de que a detecção da CgA na saliva pode ter um melhor desempenho analítico e de diagnóstico, uma vez que a amostragem salivar é não-invasiva, sem estresse, rápida, de fácil coleta, além do fato de que ao contrário da forma circulante, a CgA salivar não se liga a outras proteínas. Porém, Den et al. sugerem que, em condições fisiológicas, a CgA salivar e a circulante possuem diferentes vias de secreção, ou seja, picos de CgA salivar são vistos ao acordar e em seguida decrescem rapidamente depois de 1 hora, mantendo um nível baixo durante todo o dia, enquanto que a CgA plasmática não apresenta qualquer alteração com o ritmo circadiano (162).

Diversos estudos tem demonstrado a inter-relação entre hiperglicemia persistente e o status de saúde bucal (alterações dentárias, status periodontal, condições salivares, entre outros). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram em sua maior parte para tal premissa. Os três grupos não diferiram em relação ao índice CPOD. Esta observação é compatível com os resultados de estudos anteriores (78, 103, 107), que também não demonstraram nenhuma diferença entre os pacientes diabéticos e o grupo controle, e isso poderia ser atribuído aos fatores confundidores tais como xerostomia, doença periodontal e uma dieta restrita de carboidratos em pacientes diabéticos (13). No grupo DM2 compensados, uma correlação positiva entre o tempo de diabetes e o índice CPOD foi verificado. Isso pode ser explicado por estudos anteriores, que relataram maiores níveis de glicose na saliva (12, 127) e menor capacidade tampão da saliva em diabéticos (101, 137), que, por sua vez, pode favorecer a proliferação de microorganismos (tais como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*) e aumentar a sua colonização nos dentes e nas membranas das mucosas bucais. Entretanto, outro estudo infere que, com o aumento da duração do diabetes, os valores de glicose na saliva diminui como resultado da infiltração lipídica dos ácinos e da microangiopatia diabética das glândulas salivares (13).

A capacidade tampão da saliva é responsável pela manutenção do pH bucal, a fim de garantir a integridade do dente e inibir a produção de ácidos pelo biofilme bacteriano (163). Todos os grupos mostraram deficiência na capacidade tampão da saliva; no entanto, o grupo DM2 descompensados

apresentou valores significativamente maiores do que os outros grupos. Este resultado está de acordo com os achados de Kjellman (164), embora alguns estudos relacionaram a redução da capacidade tampão com os pacientes diabéticos (101, 158) e em um outro não foi observada diferença entre diabéticos quando comparados ao grupo controle (129). As discordâncias encontradas na literatura podem ocorrer devido à utilização de métodos colorimétricos e eletrométricos para determinar a capacidade tampão da saliva.

A padronização da definição de caso da doença periodontal é um requisito fundamental para um estudo de vigilância de base populacional da doença. No entanto, a seleção de valores limiares é crítica e não há um consenso na literatura em relação aos valores limiares para PS e PIC, nem para a quantidade de locais ou dentes que deve ser afetada para identificar a gravidade da doença periodontal. Portanto, o presente estudo não utilizou as definições de caso, mas sim discriminou os dados em termos de PS, PIC e outros parâmetros clínicos periodontais, a fim de analisar a condição periodontal dos indivíduos, e não seu diagnóstico periodontal.

Este presente estudo transversal fornece evidências para uma associação entre o controle glicêmico e a susceptibilidade para os piores parâmetros periodontais. Nossos resultados mostraram que o DM2 e a falta do controle glicêmico aumentaram o índice de placa bacteriana, sangramento à sondagem e piora da condição periodontal, coincidindo com os resultados de estudos anteriores (78, 165-167). Entretanto, diferente dos resultados dos estudos anteriores, não houve diferença estatisticamente significativa para os sítios com PS maior que 4 mm, apesar de encontrarmos nos grupos de diabéticos maior prevalência de sítios com profundidade de sondagem mais elevada, quando comparada com o grupo controle. Além disso, nossa análise constatou que PIC 4 e 5 a 6 mm foram significativamente mais elevados em ambos os grupos DM2, quando comparados ao grupo controle, e indivíduos com DM2 descompensados apresentaram significativamente maior quantidade de sítios com PIC ≥ 7 mm do que outros grupos. A diferença na prevalência entre as medidas de PS e PIC ocorre, provavelmente e pelo menos em parte, devido à recessão gengival. Uma vez que não houve diferença significativa entre os três grupos estudados para a prevalência de PS ≥ 4 mm, poderíamos sugerir que os valores da PIC podem ser mais influenciados pela recessão gengival do que pela PS ou também pela influência que o diabetes exerce sobre a doença periodontal. É importante ressaltar que a recessão gengival geralmente aumenta com a idade, e, no presente estudo, os pacientes com DM2 eram mais velhos do que o grupo controle. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à idade, o grupo DM2 compensados apresentou 65,63% dos indivíduos com mais de 55 anos de idade, enquanto o grupo DM2 descompensados apresentou 54,84% de indivíduos nesta faixa etária. Já no grupo controle a porcentagem encontrada foi de apenas 35,14%. De acordo com alguns estudos, estima-se que a perda óssea seja maior em pacientes com idade superior a 55 anos, e verificou-se que a idade mais avançada está significativamente associada à gravidade da doença periodontal (168, 169). Outro fator a ser considerado é que se trata de um estudo transversal e os parâmetros periodontais obtidos em um único ponto no tempo não refletem o curso da inflamação periodontal durante os últimos anos. Similarmente, os níveis de HbA1c refletem o controle glicêmico nos últimos 1 a 3 meses, e a glicemia em jejum revela o controle glicêmico obtido no momento do exame, o que pode variar de acordo com

a dieta, atividade física e medicações. Além do mais, a falta de diagnóstico precoce de DM, a presença de um controle glicêmico intermitente e o estado de pré-diabetes, que inicia de 7 a 10 anos antes do diagnóstico de DM podem também interferir nos resultados obtidos por estudos transversais (170).

A avaliação da perda de inserção clínica de todos os dentes da boca representa um método válido para determinar a condição periodontal global de um indivíduo. Uma vez que esse estudo adotou esse critério de avaliação, é possível evidenciar o impacto do diabetes no dano ao tecido periodontal. A associação significativa dos parâmetros periodontais para ambos os grupos diabéticos avaliados, quando comparados com controles não diabéticos, foi consistente com a de estudos anteriores (83, 171, 172). Taylor *et al.* relataram que indivíduos com diabetes tipo 2 apresentaram 4 vezes maior risco de progressão da perda óssea alveolar mais grave (173). Bandyopadhyay *et al.* (174), em uma população de afro-americanos Gullah com DM2 e sem histórico clínico recente de terapia periodontal, verificaram associações significativas entre a progressão da doença periodontal e o controle glicêmico do diabetes. No geral, esta relação entre DM2 e doença periodontal tem sido baseada no fato de que a doença periodontal inflamatória, devido a uma reação do biofilme patogênico, estimula uma inflamação sistêmica crônica, e assim contribui para a carga inflamatória cumulativa no hospedeiro (175, 176). A hiperglicemia persistente conduz a uma resposta imuno-inflamatória intensa, que precede o aparecimento de diabetes (177-179) e está ligada à resistência à insulina e ao desenvolvimento de diabetes (180), bem como às suas complicações (181).

O presente estudo também revelou taxas significativamente mais baixas dos fluxos salivares (STR e SLS) nos grupos DM2, independentemente do seu controle glicêmico. No entanto, as taxas de fluxo STE foram significativamente menores no grupo DM2 descompensados. Da mesma forma, comparando-se a percentagem de hipossalivação entre grupos, uma maior frequência de hipossalivação da STR foi encontrada em ambos os grupos diabéticos, enquanto que a hipossalivação da STE foi maior apenas no grupo DM2 descompensados (47,22%). O controle glicêmico não influenciou os resultados de saliva não estimulada (STR e SLS) em ambos os grupos de pacientes diabéticos, mas pareceu influenciar a taxa de fluxo estimulado em pacientes com DM2 descompensados. Estes resultados sugerem um nível de complicação ainda maior nas glândulas salivares, uma vez que estas não conseguem compensar a falta de saliva que é produzida no fluxo salivar em repouso. Isso tem consequências clínicas importantes, uma vez que as deficiências na STR podem ser compensadas pela mastigação, estímulos gustativos ou medicamentos. A STR provavelmente é a mais importante das secreções, uma vez que esta representa o fluxo basal, ou seja, está presente na boca por aproximadamente 14 a 16 horas do dia, sendo a principal responsável pelo conforto bucal e proteção. Geralmente, uma diminuição de 50% da STR do indivíduo produz uma sensação de boca seca (182). A saliva total estimulada está presente na boca por cerca de 2 horas do dia e tem como funções primordiais a deglutição e a limpeza bucal (183). Suh *et al.* sugerem que a taxa de secreção da saliva estimulada é correlacionada com a gravidade dos sintomas relacionados a secura da boca (184). Por isso, a hipossalivação da STR e da STE combinadas muitas vezes requer tratamento sintomático com substitutos de saliva, uma vez que as glândulas salivares não respondem favoravelmente aos estímulos.

A redução dos fluxos salivares em pacientes diabéticos está em conformidade com estudos prévios (37, 40, 127, 129-131, 153, 154, 185). As causas da secreção salivar reduzida nos pacientes diabéticos podem ser múltiplas. A prevalência da glicosúria, causada por uma hiperglicemia leve, resulta na perda de fluido e desidratação do corpo, e como consequência leva a uma diminuição da secreção salivar (130). Além disso, no decurso do diabetes, lesões estruturais de etiologias complexas relacionadas à glândulas salivares ocorrem, o que leva a desordens na produção de saliva (136). A presença em diabéticos de lesões nas glândulas salivares com sintomas de xerostomia foi confirmada na pesquisa por cintilografia de Kao et al. (186). Além disso, Chavez et al. (40) relataram que o nível de controle do diabetes é um fator de mensuração crucial para a secreção de saliva, uma vez que indivíduos com pobre controle diabético mostraram uma diminuição no fluxo de saliva estimulada. Foi demonstrado que a coexistência de fatores, tais como a neuropatia autonômica associada ao diabetes, alterações microvasculares, desequilíbrio hormonal, assim como desordens dos sistemas nervoso simpático e parassimpático, poderiam reduzir a resposta das glândulas salivares às condições locais (tal como o bolo alimentar), o que poderia estimular o fluxo salivar (13, 111, 133).

Sabino-Silva et al. (187), por sua vez, estudaram o gene SLC5A1 que codifica a proteína SGLT1, cuja função primordial é cotransportar Na⁺ e glicose, além de atuar também como um canal de água. Uma vez que a expressão de SLC5A1 fica alterada em rins de pacientes diabéticos, os autores tiveram como hipótese para o estudo supor que ela também poderia estar alterada nas glândulas salivares, contribuindo assim para a disfunção diabética. Uma diminuição significativa na secreção salivar foi encontrada nos ratos diabéticos induzidos e, muito provavelmente, a alta concentração de glicose induziu um aumento na expressão do gene SLC5A1, provocando um aumento significativo na expressão do RNAm da SGLT1 nas glândulas parótida (50%) e submandibular (30%). A análise imunohistoquímica da glândula parótida de ratos diabéticos revelou que o aumento da expressão da proteína SGLT1 na membrana luminal das células ductais pode estimular a reabsorção de água a partir da saliva primária. Além disso, a proteína SGLT1 foi reduzida em células mioepiteliais da parótida de animais diabéticos, o que, por redução da atividade contrátil celular, também poderia estar relacionada com o fluxo salivar reduzido. Após seis dias tratados com insulina, todas as alterações foram revertidas, concluindo-se portanto que o diabetes aumenta a expressão do gene SLC5A1 nas glândulas salivares, que por sua vez aumenta o teor da proteína SGLT1 na membrana luminal de células ductais, levando ao aumento da reabsorção de água; e que isso pode constituir o principal mecanismo patogênico, explicando a redução da produção de saliva em pacientes diabéticos.

Contudo, vários resultados contraditórios são relatados e não há consenso na literatura sobre a associação entre DM e disfunções das glândulas salivares (38, 132, 135, 137). Os efeitos do DM2 sobre a produção da glândula salivar têm sido previamente estudados, mas poucos estudos subdividem pacientes diabéticos segundo o status de seu controle glicêmico, e nenhum avaliou as taxas de fluxo não estimulado das glândulas salivares labiais superiores em diabéticos. Diferenças metodológicas, incluindo os critérios de seleção das amostras, desenho do estudo, tipo de medicamentos, idade, sexo, hidratação corporal, doenças coexistentes, nível de controle do diabetes,

duração e tipos de diabetes são fatores que podem ter contribuído para os resultados conflitantes encontrados.

Quanto às correlações entre as taxas de fluxos salivares estudados, uma correlação positiva da idade com o fluxo STE no grupo DM2 compensados foi encontrada, o que poderia ser explicado pelo fato de que o grupo DM2 compensados agrega pacientes mais velhos do que os outros grupos. Curiosamente, uma correlação negativa entre HbA1c e a taxa de fluxo STE foi encontrada apenas no grupo controle, o que difere de um estudo anterior que relatou uma associação entre os fluxos STR e STE e elevados níveis de HbA1c em pacientes diabéticos (188), provavelmente devido à inclusão de pacientes com ambos os tipos de diabetes.

As queixas de xerostomia foram significativamente maiores em ambos os grupos diabéticos (Tabela 5), semelhantes aos resultados encontrados na literatura (122, 129, 188, 189) e isso geralmente está associado com a hipofunção das glândulas salivares (121, 188). Embora indivíduos com xerostomia em ambos os grupos diabéticos apresentem menores taxas de fluxos salivares (STR, STE e SLS), não houve diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Tabela 14). Isso pode ser explicado pelo número substancial de indivíduos que não relataram sensação de boca seca, apesar de suas taxas de secreção salivar terem sido abaixo da normalidade, e também pelo fato de alguns indivíduos com taxa de secreção salivar normal terem relatado sensações de boca seca. A xerostomia é relacionada com a desidratação da mucosa e, caso a saliva não molhe necessariamente toda a boca de forma uniforme, é possível que, mesmo na presença de uma quantidade suficiente de saliva, áreas localizadas de secura possam disparar a sensação de boca seca (182). Fox et al. verificaram em seu estudo que o diagnóstico subjetivo para xerostomia não necessariamente identifica indivíduos com taxas de fluxo salivares baixas (190). Billings et al. constataram que a relação entre xerostomia e as taxas de fluxo salivar foi claramente verificada entre pacientes jovens; já entre os indivíduos mais velhos, as taxas dos fluxos dos participantes que relataram sintomas característicos de xerostomia foram similares aos fluxos daqueles que não relataram xerostomia (191). Carda et al. observaram uma maior prevalência de xerostomia, tanto em diabéticos tipo 1 como diabéticos tipo 2 (76,4%), quando comparados com indivíduos saudáveis (18,7%), mas não encontraram relação destes dados com os fluxos salivares (138). Vasconcelos et al. também relataram uma frequência significativa de secura bucal subjetiva em indivíduos com DM2 quando comparados a indivíduos saudáveis (12,5% versus 2,5%, $p=0,000$) (127). Já Bajaj et al. verificaram uma prevalência de xerostomia com a coexistência de distúrbios da função secretora das glândulas salivares em 14% dos pacientes DM2 (192).

Da mesma forma, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos com relação aos níveis de CgA salivar e a presença de xerostomia. Esses resultados contradizem os de Shigeyama *et al.* (53) que relataram que indivíduos com xerostomia apresentaram elevados níveis salivares de CgA se comparado aos indivíduos sem xerostomia. Esta diferença pode ser explicada pela presença de apenas três indivíduos com xerostomia no nosso grupo controle.

Por outro lado, ao se comparar o número de medicamentos com a presença de xerostomia, verificou-se, como esperado, que ambos os grupos diabéticos apresentaram maior quantidade de medicamentos prescritos em comparação com o grupo controle. Tal diferença estatística também foi

constatada nos pacientes sem xerostomia e, ao se avaliar o grupo controle, verificou-se a ausência de medicamentos ingeridos. Apesar de resultados na literatura sugerirem uma associação da quantidade de medicamentos com a presença de xerostomia (191, 193-197), esses dados devem ser analisados com cautela, uma vez que a sensação de boca seca pode estar relacionada, tanto com a maior quantidade de medicamentos ingeridos quanto com a presença do DM2. Ademais, para essa análise, a amostra de indivíduos controle com xerostomia é muito pequena, e não foi o foco do estudo comparar indivíduos com e sem xerostomia.

O mau funcionamento das glândulas salivares, resultando em taxas de fluxos salivares insuficientes e a xerostomia podem ter um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes diabéticos, e pode aumentar a suscetibilidade à cárie dentária, à doença periodontal e a infecções bucais, devido à diminuição da depuração salivar, à redução na capacidade de tamponamento, bem como à diminuição da atividade antimicrobiana (111). As deficiências salivares relatadas neste estudo podem ser decorrentes do aumento da diurese ou da poliúria, que provocam uma redução no fluido extracelular e, como consequência, afetam a produção de saliva (42). Além disso, como resultado da desregulação metabólica, o DM frequentemente acarreta alterações microvasculares que são capazes de comprometer a capacidade das glândulas salivares em responder aos estímulos neurais ou hormonais (40). A hipossalivação pode ainda ser atribuída às alterações estruturais provocadas pelo DM nas glândulas salivares, como atrofia acinar e infiltração adiposa (42).

Investigações anteriores têm indicado uma associação entre a hipertensão ou a ingestão de medicamentos anti-hipertensivos e a boca seca. Fluxos salivares reduzidos foram encontrados em indivíduos hipertensos (132, 198, 199) e em indivíduos que tomam medicamentos anti-hipertensivos, e possivelmente isso se deve aos medicamentos ingeridos (200, 201). No entanto, os nossos resultados são contraditórios porque não foram observadas entre os grupos diferenças significativas na comparação dos fluxos salivares de acordo com a presença de hipertensão e outras complicações (tais como a obesidade, nefropatia e retinopatia). Os resultados deste estudo indicam que o número de medicamentos não exercem um efeito significativo sobre as taxas de fluxo salivar em pacientes com diabetes e controles porque não foram encontradas correlações significativas, apesar de resultados anteriores sugerirem que a ingestão de medicamentos está associada a uma redução das taxas de fluxo salivar (131). Uma vez que não foi encontrada nenhuma relação nos grupos de diabéticos com parâmetros que podem influenciar as taxas de fluxo salivares (como hipertensão e o número de medicamentos), nossos dados nos permitiram separar os efeitos específicos do diabetes na secreção salivar, dos efeitos não específicos, que podem levar a resultados tendenciosos.

No presente estudo, não foi encontrada associação entre os tipos de medicamentos e as taxas de hipossalivação de STR e STE. Entretanto, com relação à hipossalivação da SLS, foi encontrada uma associação com as insulinas e análogos no grupo de pacientes DM2 descompensados. Smidt et al. em seu estudo verificaram uma menor taxa de fluxo salivar STR e SLS em pacientes DM2 que tomavam antidiabéticos orais, mais especificamente as sulfonilurías, porém não verificou essa associação para insulinas (131). Além disso, os autores não caracterizaram os pacientes diabéticos em relação ao controle glicêmico. Smith et al. por meio de uma revisão de literatura, não encontraram nenhum efeito colateral bucal relacionado à prescrição das insulinas

(202). Infelizmente, poucos dados sobre os efeitos dos medicamentos que supostamente induzem à hipofunção salivar em pacientes diabéticos tipo 2 estão disponíveis na literatura, e não há relato da influência da insulina na SLS, motivo pelo qual o exato mecanismo dessa relação ainda é desconhecido. Até o presente momento, sabe-se que os mecanismos de algumas drogas que causam disfunções salivares podem ocorrer devido à ação antocolinérgica, simpatomimética, citotóxica ou por vias de transporte de íons danificadas nas células acinares (203). Porém, o simples fato do grupo DM2 descompensados apresentar um uso significativamente maior de insulina em relação aos demais grupos, não é o suficiente para afirmar com certeza se a alteração no fluxo SLS é devido ao uso das insulinas, ou se ela está relacionada com o próprio descontrole metabólico do paciente.

Nenhuma associação significativa foi encontrada entre os níveis de CgA plasmática e os parâmetros periodontais; no entanto, no grupo controle a concentração de CgA plasmática foi positivamente correlacionada com IP, o que poderia ser explicado pelo fato dos critérios de seleção para este grupo consistirem em indivíduos sem diabetes, independentemente da condição periodontal.

Os parâmetros periodontais PS 5-6 mm e PIC 5-6 mm foram significativamente associados com o aumento dos níveis de CgA salivar nos grupos DM2. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que a CgA é produzida por células endócrinas nos ductos estriados de glândulas salivares humanas (204). Estudos anteriores também demonstraram uma associação positiva entre a CgA salivar e a extensão da periodontite. Entretanto, esses estudos avaliaram pacientes sem doenças sistêmicas (54-56). No presente estudo, os níveis mais elevados de CgA em DM2 com periodontite podem ser atribuídos à alteração das funções imunes neuroendócrinas e à uma reação do sistema nervoso ao interpretar a ativação da resposta imune como um estressor, ou podem ainda estar relacionados a uma maior carga de estresse sistêmico e a vias inflamatórias conhecidas por afetar o metabolismo da glicose.

O papel essencial das bactérias na periodontite foi estabelecido em vários estudos, mas as bactérias sozinhas são insuficientes para explicar o aparecimento ou a progressão da doença. O diabetes e o estresse psicológico foram identificados como fatores de risco importantes para periodontite. O diabetes tem muitos efeitos adversos que podem contribuir para o desenvolvimento ou a progressão da periodontite, incluindo alterações vasculares, diminuição da função dos neutrófilos, diminuição do turnover de colágeno, disfunção na predisposição genética, e alterações na microbiota gengival. No aspecto bioquímico, existe um relacionamento íntimo entre o tempo em que o corpo foi exposto à hiperglicemia e a formação de produtos finais da glicação avançada (AGE) (205). A suposta teoria é que o acúmulo de AGE induz à formação de citocinas próinflamatórias (tais como a interleucina IL-1 β) na hiperglicemia, e o baixo grau de inflamação induzida pela citocina desempenha um papel essencial no desenvolvimento da resistência à insulina e está envolvido no processo de destruição da periodontite. Da mesma forma, os patógenos periodontais secretam endotoxinas que podem aumentar a quantidade de marcadores inflamatórios, tais como a proteína C-reativa (CRP), TNF- α e IL-6. Estas citocinas, particularmente TNF- α e IL-6, aumentam a resistência à insulina. Assim, com baixa sensibilidade à insulina, a produção de proteína C-reativa ocorre. Isto conduz à

destruição das células β -pancreáticas através da apoptose, interferindo negativamente com o controle glicêmico. Diante disso, fica evidente a relação bidirecional entre o diabetes mellitus e a doença periodontal (20, 206, 207).

O estresse é considerado como uma percepção cognitiva de descontrole e/ou imprevisibilidade que é expresso em uma resposta fisiológica e comportamental (208). Os possíveis mecanismos pelos quais o estresse psicológico afeta diretamente a saúde periodontal são biológicos, tais como efeitos na circulação gengival, alterações nos componentes salivares e fluxo, alterações hormonais e baixa resistência do hospedeiro. E indiretamente seus efeitos podem ser as negligências com a higiene bucal, o tabagismo, o bruxismo, o consumo de mais gordura e açúcar na dieta (209).

Em resposta aos eventos estressantes, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é estimulada pelo hipotálamo anterior levando a secreção do hormônio liberador de corticotropina e arginina vasopressina, que atuam na glândula pituitária. Esta glândula libera hormônio adrenocorticotrófico que atua sobre o córtex adrenal e aumenta a produção e liberação de cortisol, um hormônio glicocorticóide que estimula as respostas imunes (210). O sistema nervoso autônomo (SNA) é estimulado por receptores adrenérgicos que conduzem a secreção de catecolaminas (adrenalina/noradrenalina) e a CgA pela medula adrenal e fibras nervosas sensoriais. As catecolaminas regulam a resposta imune através da estimulação da proliferação e ativação das células imunológicas (211, 212), enquanto a CgA ou seus peptídeos derivados também estão relacionados com os sistemas de imunomodulação sistêmicos e locais, estando envolvidos na produção do peptídeo antimicrobiano, na migração de células mastóideas, na produção de leucotrieno e prostaglandina e na liberação da histamina (213). Estes efeitos levam a quebra da homeostasia, aumentando a susceptibilidade às doenças periodontais.

Além disso, alguns estudos investigaram a associação entre fator psicossocial e o desenvolvimento e o prognóstico do DM. Fatores psicossociais adversos estimulam o HPA e o SNA, resultando no aumento da liberação de cortisol, adrenalina e neuropeptídeo Y. O cortisol é um hormônio do estresse que desencadeia a produção de glicose, aumenta a lipólise e os ácidos graxos não esterificados circulantes, com isso diminui a secreção de insulina pelas células beta e consequentemente, diminui a sensibilidade à insulina (214, 215). A adrenalina tem efeitos semelhantes ao cortisol no metabolismo da glicose e de lipídeos (214, 215), e o neuropeptídeo Y pode mediar a obesidade induzida por estresse e a síndrome metabólica, aumentando a adipogênese e a lipólise (216), o que resulta no mau controle do diabetes.

Diante desses pressupostos, este estudo revelou uma relação significativa entre o diabetes tipo 2, as alterações periodontais e a concentração de CgA, sugerindo pela primeira vez que os níveis de CgA foram maiores nos grupos DM2 com PS e PIC de 5 a 6 mm. Em alguns aspectos, não foram observadas diferenças significativas entre os diabéticos compensados e descompensados. No entanto, não está claro se o aumento é devido ao DM, à periodontite ou a ambos, uma vez que ambas as condições podem alterar os níveis de CgA.

Além disso, para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar se as variantes do gene da CgA influenciam o DM2, e a compará-las com a concentração de CgA plasmática e salivar. De acordo com nossos achados, foram encontradas diferenças significativas nas

concentrações da CgA salivar em pacientes com DM2 para 2 regiões de genes: a promotora e a região codificadora (éxon 6). A análise do polimorfismo rs9658635 (T-415C) na região promotora da CgA mostrou uma associação significativa entre o genótipo CC e uma maior concentração de CgA salivar em ambos os grupos DM2. Da mesma forma, quando a influência do alelo C é comparada entre os grupos, observou-se um aumento significativo da concentração de CgA salivar em ambos os grupos diabéticos.

Para as análises do polimorfismo rs9658655 (Glu264Asp) da CgA, encontramos uma concentração significativamente maior de CgA salivar em ambos os grupos DM2 com o genótipo CC, em comparação com o grupo controle. Ademais, para o alelo C do polimorfismo Glu264Asp da CgA, concentrações significativamente maiores de CgA salivar foram encontradas nos grupos de diabéticos em comparação com o grupo controle, sugerindo que esses polimorfismos podem ter consequências diretas na produção/expressão da CgA salivar nos pacientes diabéticos. Isso pode ser explicado pela expressão tecido-específica do gene, indicando que a maior expressão foi local, e, possivelmente, essa produção pode estar relacionada com o estímulo salivar. Saruta et al., em seu estudo, conseguiram comprovar que a CgA é produzida nas células serosas e ductais das glândula submandibular humana (46). Esta glândula é responsável por 70% de toda a saliva secretada na cavidade bucal. Por isso, futuros estudos devem ser explorados para verificar os polimorfismos da CgA e sua associação com a função das glândulas salivares em pacientes com DM2.

A influência dos polimorfismos da CgA sobre o mecanismo molecular, que pode afetar a concentração de CgA plasmática e salivar, não é absolutamente estabelecida na literatura. Sabe-se que a proteína CgA é a fonte do peptídeo pancreastatina (PST) (217), que antagoniza os efeitos da insulina no metabolismo da glicose e lipídeos, e possui efeito inibidor na secreção de insulina. Especula-se que a PST desempenha um papel crucial no desenvolvimento da resistência à insulina. Essa hipótese é reforçada pela observação de que os níveis de PST são elevados em indivíduos com DM2 (52, 152). Portanto, é razoável que as variantes promotoras da CgA (T-415C) e do polimorfismo Glu264Asp poderiam afetar a patogênese do DM2 através da alteração funcional da PST, pela regulação da secreção de insulina. Além disso, a importância do polimorfismo da PST foi suportada pela observação de que o polimorfismo Gly297Ser influencia na captação da glicose (152). No entanto, o papel exato da PST na patogênese da resistência à insulina e do DM2 ainda não foi elucidado.

Rao et al. (218) descreveram uma associação significativa entre a diminuição da excreção da albumina urinária e o genótipo CC do Glu264Asp, quando comparados com o genótipo GG em indivíduos não-diabéticos. Sabendo que a albuminúria é um preditor bem conhecido nos problemas renais em pacientes com DM2 (155), esta variante genética da CgA pode estar relacionada com a patogênese do DM.

Além disso, as associações entre os polimorfismos T-415C e Glu264Asp com as reduções das taxas de fluxos STR em indivíduos diabéticos foram um pouco semelhante aos resultados encontrados para a concentração de CgA salivar. Taxas de fluxo STR significativamente mais baixas foram observadas, com a presença do alelo C no polimorfismo T-415C e no éxon 6 do gene CgA nos grupos diabéticos, em comparação com o controle. Ademais, as taxas de fluxo STE foram

significativamente mais baixas nos grupos dos diabéticos, com a presença do alelo C no éxon 6, em comparação com o controle. Por outro lado, uma associação significativa no grupo DM2 descompensados foi observada para a homozigose TT do T-415C e as taxas de fluxos STR e STE reduzidos, sugerindo que a presença da homozigose TT tem um papel importante na redução das taxas de fluxo salivar no grupo DM2 descompensados. Essa observação nos incentiva a especular que talvez a homozigose TT tenha uma relação com o controle glicêmico, o que poderia explicar o porquê das maiores incidências e gravidades das complicações bucais serem encontrados em pacientes com DM2 descompensados, quando em comparação com o grupo controle.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato da CgA ser um indicador valioso do controle da atividade simpatoadrenal (217), e pela secreção salivar ser regulada pelo sistema nervoso simpático e parassimpático. Sabe-se que o DM está associado às complicações crônicas, tais como a neuropatia, disfunção do sistema nervoso autônomo, anormalidades microvasculares (3) e disfunção endotelial, que levam à deterioração da microcirculação, e que ele pode desempenhar um papel na redução da taxa de fluxo salivar e produzir diferentes efeitos nos componentes proteicos da saliva (130). Portanto, nossos resultados levantam a possibilidade de que o perfil genético da CgA de pacientes com DM2 pode produzir deficiências nas glândulas salivares, resultando em taxas de fluxo reduzido e em um aumento da concentração de CgA salivar. Isso poderia ser um indicador significativo para se estabelecer a CgA salivar como um potencial biomarcador clínico para o DM2.

Algumas limitações do presente estudo incluem o número relativamente modesto de indivíduos para avaliar o perfil genético e o fato da população brasileira ser caracterizada por uma grande heterogeneidade genética. Apesar dessas limitações, os resultados são pioneiros, uma vez que as frequências genotípicas encontradas entre os alelos não diferiram estatisticamente, mostrando que a distribuição entre os grupos foi homogênea (tabela 16) ($p > 0,05$).

Os resultados do presente estudo mostram achados e interpelações importantes, apesar de algumas limitações. Em primeiro lugar, trata-se de uma avaliação de corte transversal e, por conseguinte, não é possível estabelecer causalidade. Ademais, os parâmetros clínicos e glicêmicos foram avaliados em um único momento no tempo. Além disso, o tamanho da amostra foi ligeiramente limitado para a avaliação do perfil genético da CgA, devido aos critérios de elegibilidade rigorosos que foram implementados para garantir que o número de potenciais fatores de confusão fossem minimizados. Uma vez que o DM2 tem um grande impacto sobre a qualidade de vida, vale à pena continuar a explorar estudos longitudinais com amostras maiores para elucidar o papel fisiopatológico da CgA como um biomarcador para pacientes com DM2. Este trabalho incentiva ainda mais estudos prospectivos para verificar associações entre a CgA, o estresse psicológico e a doença periodontal em populações com ausência de diabetes e doença periodontal.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos propostos e os resultados obtidos, segundo a metodologia utilizada, pode-se concluir que:

1. O DM2 causa anormalidades no funcionamento das glândulas salivares. No entanto, pacientes DM2 descompensados têm maior influência sobre as taxas de fluxo STE.
2. Os pacientes DM2 são mais suscetíveis a danos no tecido periodontal do que ao risco de cárie.
3. Os resultados fornecem algumas evidências de que a PIC é mais pronunciada nos pacientes DM2 descompensados, sugerindo uma associação entre a progressão da perda de inserção clínica e o mau controle glicêmico do diabetes.
4. Pacientes com DM2, independente do controle glicêmico, apresentaram concentrações de CgA salivar e plasmática significativamente maiores que as do grupo controle.
5. Os resultados sugerem que a alta concentração de CgA salivar está associada com a gravidade da doença periodontal e com o diabetes, e pode ainda estar relacionada com a patogênese das duas doenças.
6. Não houve diferença estatisticamente significativa no perfil genético da CgA em indivíduos sem diabetes e nos portadores de DM2.
7. Os resultados sugerem ainda que fatores ambientais e hormonais, em conjunto com os polimorfismos genéticos da CgA em pacientes com DM2, podem estar associados a menores taxas de fluxo salivar e a maior produção de CgA salivar.

8. Referências Bibliográficas

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*. 1997;20(7):1183-97.
2. Vesterinen M, Ruokonen H, Furuholm J, Honkanen E, Meurman JH. Oral health in predialysis patients with emphasis on diabetic nephropathy. *Clinical oral investigations*. 2011;15(1):99-104.
3. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj*. 2000;321(7258):405-12.
4. Awad H, Salem A, Gadalla A, El Wafa NA, Mohamed OA. Erectile function in men with diabetes type 2: correlation with glycemic control. *International journal of impotence research*. 2010;22(1):36-9.
5. Graves DT, Kayal RA. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:1227-39.
6. Santiago JV. Overview of the complications of diabetes. *Clinical chemistry*. 1986;32(10 Suppl):B48-53.
7. Chandu A. Diabetes, wound healing and complications. *Australian dental journal*. 2013;58(4):536.
8. Clark AP. Complications and management of diabetes: a review of current research. *Critical care nursing clinics of North America*. 1994;6(4):723-34.
9. Gudbjornsdottir S, Eliasson B, Eeg-Olofsson K, Zethelius B, Cederholm J, National Diabetes R. Additive effects of glycaemia and dyslipidaemia on risk of cardiovascular diseases in type 2 diabetes: an observational study from the Swedish National Diabetes Register. *Diabetologia*. 2011;54(10):2544-51.
10. Resl M, Clodi M. [Diabetes and cardiovascular complications]. *Wiener medizinische Wochenschrift*. 2010;160(1-2):3-7.
11. Stolar M. Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus. *The American journal of medicine*. 2010;123(3 Suppl):S3-11.
12. Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1996;25(8):411-5.
13. Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2001;92(3):281-91.
14. Murrah VA. Diabetes mellitus and associated oral manifestations: a review. *Journal of oral pathology*. 1985;14(4):271-81.
15. Rees TD. The diabetic dental patient. *Dental clinics of North America*. 1994;38(3):447-63.
16. Al-Maskari AY, Al-Maskari MY, Al-Sudairy S. Oral Manifestations and Complications of Diabetes Mellitus: A review. *Sultan Qaboos University medical journal*. 2011;11(2):179-86.
17. Stegeman CA. Oral manifestations of diabetes. *Home healthcare nurse*. 2005;23(4):233-40; quiz 41-2.
18. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral diseases*. 2004;10(4):187-200.
19. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 1993;16(1):329-34.
20. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2007;44:127-53.
21. Chapple IL, Genco R, Working group 2 of joint EFPAAPw. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40 Suppl 14:S106-12.
22. Ramamurthy NS, Golub LM. Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin. *Journal of periodontal research*. 1983;18(1):23-30.
23. Golub LM, Schneir M, Ramamurthy NS. Enhanced collagenase activity in diabetic rat gingiva: in vitro and in vivo evidence. *Journal of dental research*. 1978;57(3):520-5.
24. Ainamo J, Lahtinen A, Uitto VJ. Rapid periodontal destruction in adult humans with poorly controlled diabetes. A report of 2 cases. *Journal of clinical periodontology*. 1990;17(1):22-8.
25. Zatz R, Brenner BM. Pathogenesis of diabetic microangiopathy. The hemodynamic view. *The American journal of medicine*. 1986;80(3):443-53.
26. Chittenden SJ, Shami SK. Microangiopathy in diabetes mellitus: I. Causes, prevention and treatment. *Diabetes research*. 1991;17(3):105-14.

27. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21-31.
28. Darre L, Vergnes JN, Gourdy P, Sixou M. Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: A meta-analysis of interventional studies. *Diabetes & metabolism*. 2008;34(5):497-506.
29. Teeuw WJ, Gerdes VE, Loos BG. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes care*. 2010;33(2):421-7.
30. Wang X, Han X, Guo X, Luo X, Wang D. The effect of periodontal treatment on hemoglobin a1c levels of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS one*. 2014;9(9):e108412.
31. Wang TF, Jen IA, Chou C, Lei YP. Effects of periodontal therapy on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus and periodontal disease: a meta-analysis. *Medicine*. 2014;93(28):e292.
32. Liew AK, Punnanihinont N, Lee YC, Yang J. Effect of non-surgical periodontal treatment on HbA1c: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Australian dental journal*. 2013;58(3):350-7.
33. Engebretson SP, Hyman LG, Michalowicz BS, Schoenfeld ER, Gelato MC, Hou W, et al. The effect of nonsurgical periodontal therapy on hemoglobin A1c levels in persons with type 2 diabetes and chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *Jama*. 2013;310(23):2523-32.
34. Engebretson S, Kocher T. Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology*. 2013;84(4 Suppl):S153-69.
35. Sgolastra F, Severino M, Pietropaoli D, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of periodontal treatment to improve metabolic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of periodontology*. 2013;84(7):958-73.
36. Simpson TC, Needleman I, Wild SH, Moles DR, Mills EJ. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2010(5):CD004714.
37. Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Molecular and cellular biochemistry*. 2004;261(1-2):137-42.
38. Meurman JH, Collin HL, Niskanen L, Toyry J, Alakujala P, Keinanen S, et al. Saliva in non-insulin-dependent diabetic patients and control subjects: The role of the autonomic nervous system. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1998;86(1):69-76.
39. Newrick PG, Bowman C, Green D, O'Brien IA, Porter SR, Scully C, et al. Parotid salivary secretion in diabetic autonomic neuropathy. *The Journal of diabetic complications*. 1991;5(1):35-7.
40. Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, Ship JA. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2000;89(3):305-11.
41. Chavez EM, Borrell LN, Taylor GW, Ship JA. A longitudinal analysis of salivary flow in control subjects and older adults with type 2 diabetes. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2001;91(2):166-73.
42. Carda C, Carranza M, Arriaga A, Diaz A, Peydro A, Gomez de Ferraris ME. Structural differences between alcoholic and diabetic parotid sialosis. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2005;10(4):309-14.
43. Stridsberg M, Oberg K, Li Q, Engstrom U, Lundqvist G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *The Journal of endocrinology*. 1995;144(1):49-59.
44. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Bouillon R, Lamberts SW. Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. *European journal of clinical investigation*. 1998;28(6):431-40.
45. Soell M, Feki A, Hannig M, Sano H, Pinget M, Selimovic D. Chromogranin A detection in saliva of type 2 diabetes patients. *Bosnian journal of basic medical sciences / Udruzenje basicnih medicinskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences*. 2010;10(1):2-8.
46. Saruta J, Tsukinoki K, Sasaguri K, Ishii H, Yasuda M, Osamura YR, et al. Expression and localization of chromogranin A gene and protein in human submandibular gland. *Cells, tissues, organs*. 2005;180(4):237-44.
47. O'Connor DT, Bernstein KN. Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *The New England journal of medicine*. 1984;311(12):764-70.
48. Gonzalez-Yanes C, Sanchez-Margalet V. Pancreastatin modulates insulin signaling in rat adipocytes: mechanisms of cross-talk. *Diabetes*. 2000;49(8):1288-94.

49. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature*. 1986;324(6096):476-8.
50. Aardal S, Helle KB, Elsayed S, Reed RK, Serck-Hanssen G. Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *Journal of neuroendocrinology*. 1993;5(4):405-12.
51. Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H, et al. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(6):1623-33.
52. O'Connor DT, Cadman PE, Smiley C, Salem RM, Rao F, Smith J, et al. Pancreastatin: multiple actions on human intermediary metabolism in vivo, variation in disease, and naturally occurring functional genetic polymorphism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(9):5414-25.
53. Shigeyama C, Ansai T, Awano S, Soh I, Yoshida A, Hamasaki T, et al. Salivary levels of cortisol and chromogranin A in patients with dry mouth compared with age-matched controls. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2008;106(6):833-9.
54. Hironaka M, Ansai T, Soh I, Ishisaka A, Awano S, Yoshida A, et al. Association between salivary levels of chromogranin A and periodontitis in older Japanese. *Biomedical research*. 2008;29(3):125-30.
55. Haririan H, Bertl K, Laky M, Rausch WD, Bottcher M, Matejka M, et al. Salivary and serum chromogranin A and alpha-amylase in periodontal health and disease. *Journal of periodontology*. 2012;83(10):1314-21.
56. Rai B, Kaur J, Anand SC, Jacobs R. Salivary stress markers, stress, and periodontitis: a pilot study. *Journal of periodontology*. 2011;82(2):287-92.
57. Tabish SA. Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? *International journal of health sciences*. 2007;1(2):V-VIII.
58. Federation ID. *IDF Diabetes Atlas 2013*. 1-155 p.
59. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes care*. 2015;38(Supplement 1):S8-S16.
60. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *Journal of clinical periodontology*. 2009;36(9):765-74.
61. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2003;31 Suppl 1:3-23.
62. Golub LM, Garant PR, Ramamurthy NS. Inflammatory changes in gingival collagen in the alloxan-diabetic rat. *Journal of periodontal research*. 1977;12(5):402-18.
63. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of periodontology*. 1992;63(4 Suppl):322-31.
64. Bascones-Martinez A, Gonzalez-Febles J, Sanz-Esporrin J. Diabetes and periodontal disease. Review of the literature. *American journal of dentistry*. 2014;27(2):63-7.
65. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*. 1997;14:33-53.
66. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infection and immunity*. 1996;64(7):2371-80.
67. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2001;25:8-20.
68. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *Journal of periodontology*. 2008;79(8 Suppl):1560-8.
69. Vlassara H, Striker GE. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2013;42(4):697-719.
70. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tete S, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & metabolism*. 2012;9(1):88.
71. Chapple IL, Genco R, working group 2 of the joint EFPAAPw. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of periodontology*. 2013;84(4 Suppl):S106-12.
72. Bullon P, Morillo JM, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Newman HN, Battino M. Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? *Journal of dental research*. 2009;88(6):503-18.
73. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *Journal of dental research*. 2010;89(11):1241-6.

74. Nibali L, Tatarakis N, Needleman I, Tu YK, D'Aiuto F, Rizzo M, et al. Clinical review: Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(3):913-20.
75. Sonnenschein SK, Meyle J. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontology 2000*. 2015;69(1):221-54.
76. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of periodontology*. 2013;84(4 Suppl):S113-34.
77. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *Journal of the American Dental Association*. 1990;121(4):532-6.
78. Mohamed HG, Idris SB, Ahmed MF, Boe OE, Mustafa K, Ibrahim SO, et al. Association between oral health status and type 2 diabetes mellitus among Sudanese adults: a matched case-control study. *PLoS one*. 2013;8(12):e82158.
79. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of periodontology*. 1991;62(2):123-31.
80. Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, Pettitt DJ, Saad MF, Genco RJ, et al. Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes care*. 1990;13(8):836-40.
81. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1998;3(1):30-9.
82. Taylor GW, Becker MP. Increased efficiency of analyses: cumulative logistic regression vs ordinary logistic regression. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1998;26(1):1-6.
83. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2002;30(3):182-92.
84. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of periodontology*. 1996;67(10 Suppl):1085-93.
85. Saremi A, Nelson RG, Tulloch-Reid M, Hanson RL, Sievers ML, Taylor GW, et al. Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2005;28(1):27-32.
86. Demmer RT, Desvarieux M, Holtfreter B, Jacobs DR, Jr., Wallaschofski H, Nauck M, et al. Periodontal status and A1C change: longitudinal results from the study of health in Pomerania (SHIP). *Diabetes care*. 2010;33(5):1037-43.
87. Borgnakke WS, Ylostalo PV, Taylor GW, Genco RJ. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40 Suppl 14:S135-52.
88. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology*. 2007;78(7 Suppl):1387-99.
89. Tonetti MS, Claffey N, European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32 Suppl 6:210-3.
90. Manau C, Echeverria A, Agueda A, Guerrero A, Echeverria JJ. Periodontal disease definition may determine the association between periodontitis and pregnancy outcomes. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(5):385-97.
91. Mealey BL, Oates TW, American Academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 2006;77(8):1289-303.
92. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, et al. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycosylated hemoglobin. *Journal of periodontology*. 1997;68(8):713-9.
93. Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32(3):266-72.
94. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2006;77(4):591-8.
95. Altamash M, Klinge B, Engstrom PE. Periodontal treatment and HbA1c levels in subjects with diabetes mellitus. *Journal of oral rehabilitation*. 2015.
96. Jawed M, Shahid SM, Qader SA, Azhar A. Dental caries in diabetes mellitus: role of salivary flow rate and minerals. *Journal of diabetes and its complications*. 2011;25(3):183-6.
97. Jawed M, Khan RN, Shahid SM, Azhar A. Protective effects of salivary factors in dental caries in diabetic patients of Pakistan. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:947304.

98. Tanwir F, Altamash M, Gustafsson A. Effect of diabetes on periodontal status of a population with poor oral health. *Acta odontologica Scandinavica*. 2009;67(3):129-33.
99. Kampoo K, Teanpaisan R, Ledder RG, McBain AJ. Oral bacterial communities in individuals with type 2 diabetes who live in southern Thailand. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(2):662-71.
100. Leung WK, Siu SC, Chu FC, Wong KW, Jin L, Sham AS, et al. Oral health status of low-income, middle-aged to elderly Hong Kong Chinese with type 2 diabetes mellitus. *Oral health & preventive dentistry*. 2008;6(2):105-18.
101. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Dahlen G, Rattarasarn C. Root surface and coronal caries in adults with type 2 diabetes mellitus. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2007;35(4):302-9.
102. Zielinski MB, Fedele D, Forman LJ, Pomerantz SC. Oral health in the elderly with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 2002;22(3):94-8.
103. Collin HL, Uusitupa M, Niskanen L, Koivisto AM, Markkanen H, Meurman JH. Caries in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1998;85(6):680-5.
104. Lalla E, Lamster IB. Assessment and management of patients with diabetes mellitus in the dental office. *Dental clinics of North America*. 2012;56(4):819-29.
105. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral microbiology and immunology*. 2007;22(3):175-81.
106. Soni S, Mehta M, M AD, P R, Pallavi, Kadanakuppe S, et al. Root caries among type 2 diabetes mellitus patients visiting a hospital. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 2014;34(6):273-7.
107. Lin BP, Taylor GW, Allen DJ, Ship JA. Dental caries in older adults with diabetes mellitus. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 1999;19(1):8-14.
108. Tenovuo J, Alanen P, Larjava H, Viikari J, Lehtonen OP. Oral health of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scandinavian journal of dental research*. 1986;94(4):338-46.
109. Ciantar M, Spratt DA, Newman HN, Wilson M. Development of an in vitro microassay for glucose quantification in submicrolitre volumes of biological fluid. *Journal of periodontal research*. 2002;37(2):79-85.
110. Narhi TO, Meurman JH, Odont D, Ainamo A, Tilvis R. Oral health in the elderly with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 1996;16(3):116-22.
111. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *Journal of dentistry*. 2005;33(3):223-33.
112. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1995;6(2):161-75.
113. Amerongen AV, Veerman EC. Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral diseases*. 2002;8(1):12-22.
114. Baum BJ, Yates JR, 3rd, Srivastava S, Wong DT, Melvin JE. Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. *Advances in dental research*. 2011;23(4):360-8.
115. Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *Journal of oral rehabilitation*. 2007;34(10):711-23.
116. Thelin WR, Brennan MT, Lockhart PB, Singh ML, Fox PC, Papas AS, et al. The oral mucosa as a therapeutic target for xerostomia. *Oral diseases*. 2008;14(8):683-9.
117. Nederfors T. Xerostomia and hyposalivation. *Advances in dental research*. 2000;14:48-56.
118. Porter SR, Scully C, Hegarty AM. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2004;97(1):28-46.
119. Scully C, Felix DH. Oral medicine -- update for the dental practitioner: dry mouth and disorders of salivation. *British dental journal*. 2005;199(7):423-7.
120. Lalla RV, D'Ambrosio JA. Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *Journal of the American Dental Association*. 2001;132(10):1425-32.

121. Ben-Aryeh H, Serouya R, Kanter Y, Szargel R, Laufer D. Oral health and salivary composition in diabetic patients. *Journal of diabetes and its complications*. 1993;7(1):57-62.
122. Moore PA. The diabetes-oral health connection. *Compendium of continuing education in dentistry*. 2002;23(12 Suppl):14-20.
123. Malicka B, Kaczmarek U, Skoskiewicz-Malinowska K. Selected antibacterial factors in the saliva of diabetic patients. *Archives of oral biology*. 2015;60(3):425-31.
124. Saleh J, Figueiredo MA, Cherubini K, Salum FG. Salivary hypofunction: an update on aetiology, diagnosis and therapeutics. *Archives of oral biology*. 2015;60(2):242-55.
125. Ernest SL. Dietary intake, food preferences, stimulated salivary flow rate, and masticatory ability in older adults with complete dentitions. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 1993;13(3):102-6.
126. Conner S, Iranpour B, Mills J. Alteration in parotid salivary flow in diabetes mellitus. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1970;30(1):55-9.
127. Vasconcelos AC, Soares MS, Almeida PC, Soares TC. Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. *Journal of oral science*. 2010;52(2):293-8.
128. Malicka B, Kaczmarek U, Skoskiewicz-Malinowska K. Prevalence of xerostomia and the salivary flow rate in diabetic patients. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2014;23(2):225-33.
129. Bernardi MJ, Reis A, Loguercio AD, Kehrig R, Leite MF, Nicolau J. Study of the buffering capacity, pH and salivary flow rate in type 2 well-controlled and poorly controlled diabetic patients. *Oral health & preventive dentistry*. 2007;5(1):73-8.
130. Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2000;28(5):373-81.
131. Smidt D, Torpet LA, Nauntofte B, Heegaard KM, Pedersen AM. Associations between labial and whole salivary flow rates, systemic diseases and medications in a sample of older people. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2010;38(5):422-35.
132. Streckfus CF, Marcus S, Welsh S, Brown RS, Cherry-Peppers G, Brown RH. Parotid function and composition of parotid saliva among elderly edentulous African-American diabetics. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1994;23(6):277-9.
133. Lamey PJ, Fisher BM, Frier BM. The effects of diabetes and autonomic neuropathy on parotid salivary flow in man. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1986;3(6):537-40.
134. Cherry-Peppers G, Sorkin J, Andres R, Baum BJ, Ship JA. Salivary gland function and glucose metabolic status. *Journal of gerontology*. 1992;47(4):M130-4.
135. Dodds MW, Dodds AP. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1997;83(4):465-70.
136. Panchbhai AS, Degwekar SS, Bhowte RR. Estimation of salivary glucose, salivary amylase, salivary total protein and salivary flow rate in diabetics in India. *Journal of oral science*. 2010;52(3):359-68.
137. Cristina de Lima D, Nakata GC, Balducci I, Almeida JD. Oral manifestations of diabetes mellitus in complete denture wearers. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2008;99(1):60-5.
138. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gomez de Ferraris ME, Peydro A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2006;11(4):E309-14.
139. Lopez ME, Colloca ME, Paez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A. Salivary characteristics of diabetic children. *Brazilian dental journal*. 2003;14(1):26-31.
140. Sousa RR CR, Monteiro CH, Silva SC, Nunes AB. O Paciente Odontológico Portador de Diabetes Mellitus. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2003;3(2):71-7.
141. Oxford GE, Tayari L, Barfoot MD, Peck AB, Tanaka Y, Humphreys-Beher MG. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *Journal of diabetes and its complications*. 2000;14(3):140-5.
142. Marcinkiewicz M, Grabowska SZ, Czyzewska E. Role of epidermal growth factor (EGF) in oesophageal mucosal integrity. *Current medical research and opinion*. 1998;14(3):145-53.
143. O'Connor DT, Frigon RP. Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *The Journal of biological chemistry*. 1984;259(5):3237-47.

144. O'Connor DT. Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum. *Regulatory peptides*. 1983;6(3):263-80.
145. Moulant AJ, Bevan S, White JH, Hendy GN. Human chromogranin A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(9):6918-26.
146. D'Amico M A, Ghinassi B, Izzicupo P, Manzoli L, Di Baldassarre A. Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocrine connections*. 2014;3(2):R45-54.
147. Rangon CM, Haik S, Faucheux BA, Metz-Boutigue MH, Fierville F, Fuchs JP, et al. Different chromogranin immunoreactivity between prion and a-beta amyloid plaque. *Neuroreport*. 2003;14(5):755-8.
148. Simonsen AH, McGuire J, Podust VN, Hagnelius NO, Nilsson TK, Kapaki E, et al. A novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the differential diagnosis of Alzheimer's disease versus normal aging and frontotemporal dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2007;24(6):434-40.
149. Portela-Gomes GM, Grimelius L, Stridsberg M, Bresaola E, Viale G, Pelosi G. Expression of amino acid sequences of the chromogranin A molecule and synaptic vesicle protein 2 in neuroendocrine tumors of the lung. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2005;446(6):604-12.
150. Stadinski BD, DeLong T, Reisdorph N, Reisdorph R, Powell RL, Armstrong M, et al. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nature immunology*. 2010;11(3):225-31.
151. Loh YP, Koshimizu H, Cawley NX, Tota B. Serpinins: role in granule biogenesis, inhibition of cell death and cardiac function. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(24):4086-92.
152. Funakoshi A, Tateishi K, Shinozaki H, Matsumoto M, Wakasugi H. Elevated plasma levels of pancreastatin (PST) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Regulatory peptides*. 1990;30(2):159-64.
153. Khovichunkit SO, Suwantuntula T, Thaweboon S, Mitrirattanakul S, Chomkhakhai U, Khovichunkit W. Xerostomia, hyposalivation, and oral microbiota in type 2 diabetic patients: a preliminary study. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2009;92(9):1220-8.
154. Senthilkumar B, Sathasivasubramanian S. The Role of Salivary Gland Scintigraphy in the Evaluation of Salivary Gland Dysfunction in Uncontrolled Type II Diabetic Patients. *World journal of nuclear medicine*. 2013;12(3):94-100.
155. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes care*. 2014;37 Suppl 1:S14-80.
156. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International dental journal*. 1975;25(4):229-35.
157. Falcao DP, Leal SC, Vieira CN, Wolff A, Almeida TF, Nunes Fde P, et al. Sialometry of upper labial minor glands: a clinical approach by the use of weighing method Schirmer's test strips paper. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:268634.
158. Bouchard P, Boutouyrie P, Mattout C, Bourgeois D. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *Journal of periodontology*. 2006;77(3):479-89.
159. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1999;4(1):1-6.
160. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
161. Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, Huang M, Obara T, Narita S, et al. Clinical significance of polymorphism and expression of chromogranin a and endothelin-1 in prostate cancer. *The Journal of urology*. 2010;184(3):1182-8.
162. Den R, Toda M, Nagasawa S, Kitamura K, Morimoto K. Circadian rhythm of human salivary chromogranin A. *Biomedical research*. 2007;28(1):57-60.
163. Moritsuka M, Kitasako Y, Burrow MF, Ikeda M, Tagami J, Nomura S. Quantitative assessment for stimulated saliva flow rate and buffering capacity in relation to different ages. *Journal of dentistry*. 2006;34(9):716-20.
164. Kjellman O. Secretion rate and buffering action of whole mixed saliva in subjects with insulin-treated diabetes mellitus. *Odontologisk revy*. 1970;21(2):159-68.
165. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *Journal of periodontology*. 1996;67(11):1185-92.
166. Morton AA, Williams RW, Watts TL. Initial study of periodontal status in non-insulin-dependent diabetics in Mauritius. *Journal of dentistry*. 1995;23(6):343-5.

167. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *Journal of periodontology*. 2005;76(3):418-25.
168. Cerda J, Vazquez de la Torre C, Malacara JM, Nava LE. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). The effect of age and time since diagnosis. *Journal of periodontology*. 1994;65(11):991-5.
169. Choi YH, McKeown RE, Mayer-Davis EJ, Liese AD, Song KB, Merchant AT. Association between periodontitis and impaired fasting glucose and diabetes. *Diabetes care*. 2011;34(2):381-6.
170. Santos VR, Lima JA, Miranda TS, Feres M, Zimmermann GS, Nogueira-Filho Gda R, et al. Relationship between glycemic subsets and generalized chronic periodontitis in type 2 diabetic Brazilian subjects. *Archives of oral biology*. 2012;57(3):293-9.
171. Khader YS, Albashaireh ZS, Hammad MM. Periodontal status of type 2 diabetics compared with nondiabetics in north Jordan. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit*. 2008;14(3):654-61.
172. Susanto H, Nesse W, Dijkstra PU, Hoedemaker E, van Reenen YH, Agustina D, et al. Periodontal inflamed surface area and C-reactive protein as predictors of HbA1c: a study in Indonesia. *Clinical oral investigations*. 2012;16(4):1237-42.
173. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *Journal of periodontology*. 1998;69(1):76-83.
174. Bandyopadhyay D, Marlow NM, Fernandes JK, Leite RS. Periodontal disease progression and glycaemic control among Gullah African Americans with type-2 diabetes. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(6):501-9.
175. Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *Journal of periodontology*. 2005;76(11 Suppl):2106-15.
176. Renvert S, Pettersson T, Ohlsson O, Persson GR. Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome. *Journal of periodontology*. 2006;77(7):1110-9.
177. Duncan BB, Schmidt MI, Offenbacher S, Wu KK, Savage PJ, Heiss G. Factor VIII and other hemostasis variables are related to incident diabetes in adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes care*. 1999;22(5):767-72.
178. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*. 1999;353(9165):1649-52.
179. Duncan BB, Schmidt MI. The epidemiology of low-grade chronic systemic inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes technology & therapeutics*. 2006;8(1):7-17.
180. Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes care*. 2013;36(1):166-75.
181. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of periodontology*. 2008;79(8 Suppl):1527-34.
182. Dawes C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *Journal of dental research*. 1987;66 Spec No:648-53.
183. Bretz WA, Loesche WJ, Chen YM, Schork MA, Dominguez BL, Grossman N. Minor salivary gland secretion in the elderly. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2000;89(6):696-701.
184. Suh KI, Lee JY, Chung JW, Kim YK, Kho HS. Relationship between salivary flow rate and clinical symptoms and behaviours in patients with dry mouth. *Journal of oral rehabilitation*. 2007;34(10):739-44.
185. Sharon A, Ben-Aryeh H, Itzhak B, Yoram K, Szargel R, Gutman D. Salivary composition in diabetic patients. *Journal of oral medicine*. 1985;40(1):23-6.
186. Kao CH, Tsai SC, Sun SS. Scintigraphic evidence of poor salivary function in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2001;24(5):952-3.
187. Sabino-Silva R, Freitas HS, Lamers ML, Okamoto MM, Santos MF, Machado UF. Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow. *The Journal of membrane biology*. 2009;228(2):63-9.
188. Sreebny LM, Yu A, Green A, Valdini A. Xerostomia in diabetes mellitus. *Diabetes care*. 1992;15(7):900-4.
189. Ben-Aryeh H, Cohen M, Kanter Y, Szargel R, Laufer D. Salivary composition in diabetic patients. *The Journal of diabetic complications*. 1988;2(2):96-9.
190. Fox PC, Busch KA, Baum BJ. Subjective reports of xerostomia and objective measures of salivary gland performance. *Journal of the American Dental Association*. 1987;115(4):581-4.

191. Billings RJ, Proskin HM, Moss ME. Xerostomia and associated factors in a community-dwelling adult population. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1996;24(5):312-6.
192. Bajaj S, Prasad S, Gupta A, Singh VB. Oral manifestations in type-2 diabetes and related complications. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2012;16(5):777-9.
193. Smidt D, Torpet LA, Nauntofte B, Heegaard KM, Pedersen AM. Associations between oral and ocular dryness, labial and whole salivary flow rates, systemic diseases and medications in a sample of older people. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2011;39(3):276-88.
194. Thomson WM. Issues in the epidemiological investigation of dry mouth. *Gerodontology*. 2005;22(2):65-76.
195. Sreebny LM, Valdini A, Yu A. Xerostomia. Part II: Relationship to nonoral symptoms, drugs, and diseases. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1989;68(4):419-27.
196. Nederfors T, Isaksson R, Mornstad H, Dahlof C. Prevalence of perceived symptoms of dry mouth in an adult Swedish population--relation to age, sex and pharmacotherapy. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1997;25(3):211-6.
197. Thomson WM, Chalmers JM, Spencer AJ, Slade GD. Medication and dry mouth: findings from a cohort study of older people. *Journal of public health dentistry*. 2000;60(1):12-20.
198. van Hooff M, van Baak MA, Schols M, Rahn KH. Studies of salivary flow in borderline hypertension: effects of drugs acting on structures innervated by the autonomic nervous system. *Clinical science*. 1984;66(5):599-604.
199. Rahn KH, van Baak M, van Hooff M, Schols M. Studies on salivary flow in borderline hypertension. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1983;1(2):77-8.
200. Persson RE, Izutsu KT, Treulove EL, Persson R. Differences in salivary flow rates in elderly subjects using xerostomatic medications. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1991;72(1):42-6.
201. Nederfors T, Dahlof C. Effects of the beta-adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human whole saliva flow rate and composition. *Archives of oral biology*. 1992;37(7):579-84.
202. Smith RG, Burtner AP. Oral side-effects of the most frequently prescribed drugs. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 1994;14(3):96-102.
203. Napenas JJ, Brennan MT, Fox PC. Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*. 2009;97(2):76-83.
204. Dag E, Aydin S, Ozkan Y, Erman F, Dagli AF, Gurger M. Alteration in chromogranin A, obestatin and total ghrelin levels of saliva and serum in epilepsy cases. *Peptides*. 2010;31(5):932-7.
205. Ahmed N, Thornalley PJ. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes, obesity & metabolism*. 2007;9(3):233-45.
206. Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing research reviews*. 2002;1(1):1-15.
207. Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *Journal of periodontal research*. 1996;31(7):508-15.
208. Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2011;35(5):1291-301.
209. LeResche L, Dworkin SF. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontology 2000*. 2002;30:91-103.
210. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*. 2002;53(4):865-71.
211. Sanders VM, Straub RH. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain, behavior, and immunity*. 2002;16(4):290-332.
212. Hamaguchi T, Fukudo S, Kanazawa M, Tomiie T, Shimizu K, Oyama M, et al. Changes in salivary physiological stress markers induced by muscle stretching in patients with irritable bowel syndrome. *BioPsychoSocial medicine*. 2008;2:20.
213. Helle KB. Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II. *Cellular and molecular neurobiology*. 2010;30(8):1145-6.
214. Lundberg U. Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(10):1017-21.
215. Bhathena SJ. Relationship between fatty acids and the endocrine and neuroendocrine system. *Nutritional neuroscience*. 2006;9(1-2):1-10.

216. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature medicine*. 2007;13(7):803-11.
217. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *The New England journal of medicine*. 2003;348(12):1134-49.
218. Rao F, Wessel J, Wen G, Zhang L, Rana BK, Kennedy BP, et al. Renal albumin excretion: twin studies identify influences of heredity, environment, and adrenergic pathway polymorphism. *Hypertension*. 2007;49(5):1015-31.

**9. *Artigos
publicados e
enviados***

Manuscrito 1: Impact of glycemic control on oral health status in type 2 diabetes individuals and its association with salivary and plasma levels of chromogranin A

Aceito na revista Archives of Oral Biology

Fator de Impacto: 1.735

Extrato Capes: B2 (Medicina I)

Accepted Manuscript

Title: Impact of glycemic control on oral health status in type 2 diabetes individuals and its association with salivary and plasma levels of chromogranin A

Author: Evelyn Mikaela Kogawa Daniela Corrêa Grisi Denise Pinheiro Falcão Ingrid Aquino Amorim Taia Maria Berto Rezende Izabel Cristina Rodrigues da Silva Osmar Nascimento Silva Octávio Luiz Franco Rivadávio Fernandes Batista de Amorim



PII: S0003-9969(15)30078-9
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.archoralbio.2015.11.005>
Reference: AOB 3496

To appear in: *Archives of Oral Biology*

Received date: 23-2-2015
Revised date: 5-11-2015
Accepted date: 8-11-2015

Please cite this article as: Kogawa Evelyn Mikaela, Grisi Daniela Corrêa, Falcão Denise Pinheiro, Amorim Ingrid Aquino, Rezende Taia Maria Berto, da Silva Izabel Cristina Rodrigues, Silva Osmar Nascimento, Franco Octávio Luiz, de Amorim Rivadávio Fernandes Batista. Impact of glycemic control on oral health status in type 2 diabetes individuals and its association with salivary and plasma levels of chromogranin A. *Archives of Oral Biology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.11.005>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Impact of glycemic control on oral health status in type 2 diabetes individuals and its association with salivary and plasma levels of chromogranin A



Evelyn Mikaela Kogawa^{a,b,*}, Daniela Corrêa Grisi^b, Denise Pinheiro Falcão^a, Ingrid Aquino Amorim^{c,d}, Taia Maria Berto Rezende^{b,c,d}, Izabel Cristina Rodrigues da Silva^e, Osmar Nascimento Silva^f, Octávio Luiz Franco^{d,g,h}, Rivadávio Fernandes Batista de Amorim^a

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro—Asa Norte, CEP 70910-900 Brasília-DF, Brazil

^b Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01 EPCT Campus I Bloco S, CEP 71966-700 Taguatinga-DF, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro—Asa Norte, CEP 70910-900 Brasília, Brazil

^d Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Campus avançado Asa Norte—SGAN 916 módulo B avenida W5CEP 70790-160 Brasília, Brazil

^e FCE, Universidade de Brasília, Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, CEP 72220-900, Brasília, Brazil

^f Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biotecnologia e Genética), Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n—Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora, Brazil

^g Programa de Doutorado da Rede Centro-Oeste, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Esplanada dos Ministérios Bloco E, 2º andar, Sala 242, CEP 70067-900 Brasília, DF, Brazil

^h S-Inova, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, CEP 79117-900 Campo Grande, MS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2015

Received in revised form 5 November 2015

Accepted 8 November 2015

Keywords:

Type 2 diabetes
Chromogranin A
Periodontitis
Stress
Saliva
Oral health

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of glycemic control status in type 2 diabetes mellitus (T2DM) individuals on clinical oral health indicators and to compare the concentrations of plasma and salivary chromogranin A (CHGA) among nondiabetic subjects and T2DM patients, exploring their associations.

Design: In this cross-sectional study, 32 patients with controlled T2DM, 31 with poorly controlled T2DM and 37 nondiabetic subjects underwent a clinical and periodontal examination. CHGA concentrations were determined in saliva and plasma with ELISA.

Results: Poorly controlled T2DM group exhibited significantly higher mean buffering capacity, plaque index and bleeding on probing than other groups ($P < 0.05$). No difference was found to DMFT (decayed, missed and filled teeth) index between groups. Sites with clinical attachment loss (CAL) of 4 and 5–6 mm were significantly higher in both diabetic groups compared to control group ($P < 0.05$). Poorly controlled T2DM group had significantly higher sites with CAL ≥ 7 mm than other groups ($P = 0.001$). Significantly higher plasma and salivary CHGA levels were found in T2DM groups ($P < 0.05$). In both diabetic groups, probing depths 5–6 mm and CAL 5–6 mm were associated with higher salivary CHGA concentration ($P < 0.05$).

Conclusions: The findings revealed that T2DM patients were more prone to periodontal tissue damage than to caries risk. The results also provide some evidence that the degree of attachment loss deteriorates

Abbreviations: DM, diabetes mellitus; T2DM, type 2 diabetes mellitus; CHGA, chromogranin A; DMFT, decayed, missed and filled teeth; FPG, fasting plasma glucose; HbA1c, glycated hemoglobin; BMI, body mass index; SWS, stimulated whole saliva; PI, plaque index; CAL, clinical attachment loss; PD, probing depth; BOP, bleeding on probing; ICCs, intraclass correlation coefficients; HPA, hypothalamus–pituitary–adrenal; ANS, autonomous nervous system; PST, pancreastatin; AGEs, advanced glycation end products; IL-1, interleukin-1; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; IL-6, interleukin-6.

* Corresponding author at: Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01 EPCT Campus I Bloco S—Sala S213, CEP 71966-700 Taguatinga, DF, Brazil.

E-mail addresses: mikaela.kogawa@gmail.com (E.M. Kogawa), dgrisi@terra.com.br (D.C. Grisi), dfalcao@terra.com.br (D.P. Falcão), ingridaquinos2@gmail.com (I.A. Amorim), taiambr@gmail.com (T.M.B. Rezende), belbiomedica@gmail.com (I.C.R. da Silva), osmar.silva@catolica.edu.br (O.N. Silva), ocfranco@gmail.com (O.L. Franco), rivadavioamorim@hotmail.com (R.F.B. de Amorim).

significantly with poor glycemic control in T2DM ($CAL \geq 7$ mm). Moreover, the results suggest that high concentrations of salivary CHGA are associated with worse periodontal parameters and T2DM, and this could be related to the pathogenesis of both diseases.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is characterized by chronic hyperglycemia as a result of impaired insulin secretion and insulin resistance (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997). Several reports have shown that diabetes mellitus (DM) is associated with an increased risk of developing oral complications such as xerostomia, salivary gland hypofunction, taste impairment, tooth loss, periodontal disease, oral mucosa lesions, dental caries, oral candidiasis (Loe, 1993; Chavez, Taylor, Borrell, & Ship, 2000; Moore, 2002; Mealey & Ocampo, 2007) and vulnerable to impaired wound healing (Edgar, 1992; Moore, Guggenheimer, Etzel, Weyant, & Orchard, 2001).

According to some studies the caries risk in T2DM patients have yielded controversial results. For instance, similar, higher, and lower number of decayed, missed and filled teeth (DMFT) in diabetic patients has been reported (Collin et al., 1998; Jawed, Shahid, Qader, & Azhar, 2011; Leung et al., 2008; Mohamed et al., 2013; Soni, Mehta, Pallavi, & Kadanakuppe, 2014). Similarly, equivocal evidence for buffering capacity has been found in some studies (Kjellman, 1970; Bernardi et al., 2007; Cristina de Lima, Nakata, Balducci, & Almeida, 2008; Hintao, Teanpaisan, Chongsu-ivatwong, Dahlen, & Rattarasarn, 2007). Thus, there is a need to address the clear relationship between caries incidence and buffering capacity in T2DM patients.

Moreover, a substantial number of studies have considered the periodontal disease a major oral complication of diabetes and strong evidence tends to support the association between periodontitis and DM as a reciprocal influence. It is known that metabolic changes in periodontal tissues may reduce resistance to infection and diabetes also influence the initiation, development and progression of inflammatory periodontal disease (Preshaw et al., 2012; Taylor, Preshaw, & Lalla, 2013). However, local (e.g. periodontal infection) and systemic infections exacerbate host response and contribute to accelerating the development of insulin resistance and, consequently, the onset of T2DM and its complications. In this regard, some studies have demonstrated the favorable effect of periodontal therapy on metabolic control of patients with poorly controlled diabetes (Taylor, 2003; Darre, Vergnes, Gourdy, & Sixou, 2008; Janket, Wightman, Baird, Van Dyke, & Jones, 2005; Simpson, Needleman, Wild, Moles, & Mills, 2010; Teeuw, Gerdes, & Loos, 2010).

Currently, psychological stress is also considered as risk factor influencing periodontal disease onset and progression. The concentration of chromogranin A (CHGA) is known to increase in response to psychological and physical stress and it is widely used as indicator of stress (Zheng & Moritani, 2008). Chromogranin A is an acidic glycoprotein located in the secretory vesicles of neurons and endocrine cells (Saruta et al., 2005), and has proven useful as a biological marker of sympathetic nerve activity (O'Connor and Bernstein, 1984). Recent data suggest an association with high levels of salivary CHGA and periodontitis (Haririan et al., 2012; Hironaka et al., 2008; Rai, Kaur, Anand, & Jacobs, 2011). Beside this, CHGA is also a pro-hormone that gives rise to a biologically active peptide, the pancreastatin (human CHGA250–301) (Taupenot, Harper, & O'Connor, 2003). Pancreastatin exerts multiple potentially dysglycemic actions including elevation of blood glucose by inhibition of glucose-stimulated insulin release from pancreatic islet beta cells (Tatemoto et al., 1986) and

inhibition of glucose uptake by adipocytes and hepatocytes (Gonzalez-Yanes & Sanchez-Margalet, 2000). For this reason, it has been suggested that CHGA could contribute to the development of insulin resistance, since previous study has documented the clinical value of measurements of CHGA as a potential marker for diabetes (Soell et al., 2010).

Despite these facts, whether the concentration of CHGA is related and influences periodontal disease and caries risk in T2DM patients has never been investigated. Therefore, the aims of this cross-sectional study were to investigate the effect of glycemic control status in T2DM individuals on clinical oral health indicators (buffering capacity, periodontal and dental caries status) and to conduct a comparative analysis of the concentrations of plasma and salivary CHGA among nondiabetic subjects and T2DM patients (well controlled and poorly controlled). Furthermore, this investigation also verified associations between oral health status and CHGA.

2. Patients and methods

The research protocol was conducted in accordance with Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of Universidade Católica de Brasília (Protocol #160/11), Brazil. All participants provided written informed consent.

A sample size of at least 28 patients in each group was determined to achieve 80% power to detect a significantly difference of 0.34 pmol/mL of CHGA levels, with a standard deviation intra group equal to 0.25 pmol/mL deviation (based on preliminary data—pilot study), at a significance level of 0.05 (data not shown).

This cross-sectional study was conducted using a convenience sample selected among nondiabetic individuals and those with T2DM (both genders, aged 34–70 years old). Initially, a total of 309 diabetic patients and 55 nondiabetic subjects participated in the oral and systemic examinations, which was carried out between August 2011 and December 2013. Selection criteria for this study included the following: voluntary participation, individuals with at least 6 teeth and confirmed type 2 diabetes mellitus. Individuals without diabetes met the same inclusion criteria except the diabetes diagnosis and had any previous consumption of anti-inflammatory and/or antibiotics drugs (3 months before study inclusion). Exclusion criteria for all groups were: transplanted and/or epileptic; pregnancy; mental diseases; use of electronic devices such as pacemakers; insulin pumps and brain drain; difficulty of coordination; presence of oral and facial lesions suspected of malignancy; illicit drug users; presence of systemic conditions, such as hypothyroidism, history of radiotherapy in the head and neck regions, chemotherapy in the preceding 3 months.

A total of 100 age- and sex-matched subjects were evaluated and separated into three groups: 37 control subjects, 32 patients with glycemic controlled T2DM and 31 patients with poorly controlled T2DM. The drop-out causes included: exclusion owing to inadequate data ($n = 49$), failing to conform to the inclusion and exclusion criteria ($n = 107$), refusal to participate ($n = 41$), edentulism ($n = 10$) and for pairing between the age groups ($n = 57$). A comparison of baseline parameters was performed by means of a 1-way factorial analysis of variance to test the homogeneity of the 3 groups. However, after the exclusion of individuals by the purpose of pairing the ages between the groups, there was no need

to exclude any individual to even the genders, because the sample was already matched for both matters.

Fasting plasma glucose (FPG) (mg/dL) and glycated hemoglobin (HbA1c) in all participants were recorded in the peripheral blood. Diabetic patients were divided into two groups according to their glycemic control levels, based on criteria given by American Diabetes Association ([American Diabetes A, 2014](#)). Glycated hemoglobin values were used to evaluate the glycemic control, performing with less than three months before the saliva collection period. Thus, group 1 comprised patients with well-controlled type 2 diabetes (HbA1C < 7%) and group 2 included poorly controlled patients (HbA1C ≥ 7%).

Prior to testing, information regarding sociodemographic status and general and oral health related behaviors were obtained from structured questionnaires used during an interview conducted by dentists. Anthropometric assessment included measurements of weight (kg) and height (m) for the calculation of body mass index (BMI).

The presence of visible plaque was the first test recorded in order to prevent the biofilm removal during the salivary collections, avoiding a false negative result. The plaque index system has been described by Ainamo and Bay ([Ainamo & Bay, 1975](#)) recommending the analysis of 4 teeth surfaces (mesial, buccal, lingual and distal) without the use of disclosing solution or a periodontal probe, considering therefore, only the presence or absence of visible plaque dryness.

2.1. Saliva and plasma collection

Unstimulated and stimulated saliva was collected between 8:00 and 11:00 a.m. to minimize the effect of circadian rhythms. Participants were instructed not to eat, drink, smoke or perform hygienic habits for at least 2 h before the saliva measurements to avoid any kind of contamination in the saliva samples.

Unstimulated whole saliva (UWS) was collected by draining method in order to evaluate buffering capacity ([Falcao et al., 2014](#)). The collection was completed as soon as 1 mL of saliva was reached. Thereafter, the buffering capacity was determined after the addition of 3 mL of 0.005 M hydrochloric acid in 1 mL of unstimulated saliva. After 2 min, the pH was measured with indicator strips in different scales (pH-FIX test strips, pH 0–14, Macherey-Nagel, Duren, Germany), considering as low buffering capacity when pH < 4.5 ([Cristina de Lima et al., 2008](#)).

Stimulated whole saliva (SWS) was collected by chewing on a sterilized cylindrical silicone device (1 cm in length and 5 mm in diameter) tied to a dental floss, into a sterile universal collector ([Falcao et al., 2014](#)). The collection was completed as soon as 2 mL whole saliva was collected or 5 min of sampling time had elapsed. Individuals with removable dentures were instructed to wear their prosthetic appliances during saliva collection. Peripheral whole blood was collected only after saliva sampling to minimize alterations of salivary biomarker due to possible anxious reactions to the blood collection.

2.2. CHGA analyses

The saliva (SWS) sample was subsequently placed in 15 mL Falcon tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). All samples (SWS and blood) were centrifuged at 1620 × g for 5 min at 4 °C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG Mark Hamburg, Germany). The supernatants were collected and divided into several aliquots that were quick-frozen and stored at –80 °C until analysis. The concentration of CHGA in SWS and plasma (pmol/mL) were determined using the YK070Chromogranin A (Human) EIA kit (Yanaihara Institute Inc., Japan) with a lower sensitivity limit of 0.01 pmol/mL, according to the manufacturer's recommendations.

2.3. Clinical examination

Oral examinations were performed in the Dental Clinic of Universidade Católica de Brasília. The number of teeth and coronary caries (DMFT index) were examined on full mouth, according to the criteria of the World Health Organization (WHO). DMFT index scores represent the total number of decayed, filled, or missing teeth (permanent dentition).

To assess the periodontal status, probing depth (PD), bleeding on probing (BOP), gingival recession and clinical attachment loss (CAL) were measured with a marked periodontal probe (UNC-15 probe, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). All teeth present were probed at six sites: mesio-lingual, mid-lingual, disto-lingual, mesio-buccal, mid-buccal and disto-buccal. Bleeding on probing was measured as absent or present. Probing depth was defined as the distance from the soft tissue margin to the tip of the probe ([Bouchard, Boutouyrie, Mattout, & Bourgeois, 2006](#)). The clinical attachment loss was calculated from recession and probing depth measures and represents the distance in millimeters from cemento–enamel junction to periodontal ligament attachment. Probing depths and clinical attachment loss were categorized as ≤ 3 mm, 4 mm, 5–6 mm and ≥ 7 mm. All periodontal examinations were performed by two previously trained dentists. Prior to clinical examination, the examiners received extensive training of all study protocols. Disagreements were resolved by discussion between the examiners. After training, repeated tests were conducted by dentists to achieve agreement between 80 and 90% on repeated measurements of all examination protocols. For calibration sessions, 14 volunteers were evaluated on two occasions with an interval of 1 week of the first examination. For inter-examiner reliability, intraclass correlation coefficients (ICCs) for the means of the PD and CAL were 0.981 for examiner 1 and examiner 2 to 0.976 ($P < 0.001$). For intra-examiner reliability, the ICCs for examiner 1 versus 2 were 0.964 for the first time and second time 0.963 ($P < 0.001$). The coefficient of intra and interclass correlation were 0.914 and 0.886 ($P < 0.001$), respectively, for PD and 0.979 and 0.956 ($P < 0.001$), respectively, for CAL.

The interexaminer reliability for PD and CAL assessments had a weighted Kappa index of 0.508 and 0.703 ($P < 0.05$), respectively. Moreover, the intraexaminer reliability had a Kappa index of 0.679 for PD and 0.842 for CAL, respectively ($P < 0.001$).

2.4. Statistical analysis

All data were analyzed using IBM SPSS Statistics version 20.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA). Demographic variables and clinical parameters are presented as the mean ± SD or median and percentiles in each group. Continuous variables were tested for normal distribution by the Shapiro–Wilk test. Comparisons between groups were performed using ANOVA one way with Tukey post test for normally distributed data or Kruskal–Wallis with Dunn multiple comparison test for non-normally distributed data, as well as Student's *t* and Mann–Whitney *U* Tests were calculated when appropriate. Pearson's correlation test was used to verify the existence of relationship between salivary flow rates and demographic and biochemical parameters. The chi-square test was used to analyze categorized variables. All reported values were compared to a significance level at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Sociodemographic, clinical and metabolic characteristics

The BMI, hypertension, and retinopathy were found to be significantly higher in diabetic groups (well controlled and poorly controlled) compared to controls, whereas systolic blood pressure

was found to be significantly higher in T2DM poorly controlled as compared to other groups. As expected, there were significant group differences in fasting plasma glucose and HbA1c. The median time since DM2 diagnosis was 4.00 years in controlled group and 8.00 in poorly controlled group ($P=0.016$), suggesting that the evolution time of the DM had a significant relationship with the metabolic control. The Table 1 summarizes the socio-demographic and general clinical parameters of all groups.

3.2. DMFT index, buffering capacity and periodontal parameters

There were no statistical differences between the groups regarding to the number of teeth, DMFT index and DMFT components. In the controlled T2DM group, the duration of diabetes was positively correlated with DMFT index ($r=0.485$, $P=0.005$) and age ($r=0.431$, $P=0.014$). In the same group, the time of diabetes diagnosis was negatively correlated with the number of teeth ($r=-0.502$, $P=0.003$), PD ≤ 3 mm ($r=-0.427$, $P=0.015$) and CAL ≤ 3 mm ($r=-0.410$, $P=0.020$).

The group of poorly controlled T2DM exhibited significantly higher mean buffering capacity, plaque index and BOP than other groups ($P=0.022$, $P=0.002$ and $P=0.004$, respectively). Furthermore in the same group, the buffering capacity was positively correlated with plaque index ($r=0.468$, $P=0.008$).

Clinical parameters PD showed no difference between groups, however sites with CAL ≤ 3 mm were significantly less frequent in poorly controlled T2DM group when compared to control group

($P=0.007$), whereas sites with CAL 4 and CAL 5–6 mm were more frequently observed in both diabetic groups compared to control ($P=0.021$ and $P=0.002$, respectively). Sites with CAL ≥ 7 mm had highest median value in poorly controlled T2DM group than those of the control ($P=0.001$) and controlled T2DM groups ($P=0.002$) (Table 2).

3.3. Concentration of plasma and salivary CHGA

The concentration of plasma and salivary CHGA was significantly higher in diabetic groups compared to the control ($P=0.036$ and $P=0.001$, respectively) (Fig. 1 A and B).

The concentration of plasma and salivary CHGA were correlated with the clinical parameters across the entire sample combining all groups. Among those parameters, both plasma and salivary CHGA levels were negatively correlated with CAL ≤ 3 mm ($r=-0.265$, $P=0.008$ and $r=-0.295$, $P=0.003$, respectively) and positively correlated with CAL 4 mm ($r=0.344$, $P<0.001$ and $r=0.372$, $P<0.0005$), respectively) and CAL 5–6 mm ($r=0.207$, $P=0.038$ and $r=0.231$, $P=0.021$). Moreover, the salivary CHGA levels were positively correlated plaque index ($r=0.330$, $P=0.001$), buffering capacity ($r=0.404$, $P<0.0005$) and plasma CHGA levels ($r=0.406$, $P<0.0005$), whereas plasma CHGA levels were positively correlated with age ($r=0.338$, $P=0.001$) and diabetes duration ($r=0.231$, $P=0.021$).

In control group, there was no significant correlation between the concentration of salivary CHGA and clinical and periodontal

Table 1
Socio-demographic and clinical measures across subjects groups.

Parameters	Groups			P value	
	Control (n=37)	Controlled T2DM (n=32)	Poorly controlled T2DM (n=31)	Among groups	Between groups
Age, years (median) (25th, 75th percentile)	51.00 (49.00, 55.00)	57.50 (51.00, 61.50)	56.00 (47.00, 63.00)	0.062 ^d	NA
Male:female (n) (%)	18:19 (48.65: 51.35)	12:20 (37.50: 62.50)	12:19 (38.71: 61.29)	0.584 ^e	NA
Education (n) (%)					
Less than high school	19 (51.35)	23 (71.88)	18 (58.06)	0.214 ^e	NA
High school	14 (37.84)	5 (15.63)	12 (38.71)	0.074 ^e	NA
More than high school	4 (10.81)	4 (12.50)	1 (3.23)	0.389 ^e	NA
Job status (n) (%)					
Not employed	15 (40.54)	20 (62.50)	15 (48.39)	0.187 ^e	NA
Employed	22 (59.46)	12 (37.50)	16 (51.61)		
Smoking (current/never/former) (n) (%)	8/21/8 (21.62/56.76/21.62)	1/22/9 (3.13/68.75/28.13)	4/20/7 (12.90/64.52/22.58)	0.261 ^e	NA
Alcohol consumption (current/never/former) (n) (%)	9/24/4 (24.32/64.86/10.81)	7/22/3 (21.88/68.75/9.38)	4/22/5 (12.90/70.9/16.13)	0.746 ^e	NA
BMI, kg/m ² (mean \pm standard deviation)	25.47 \pm 4.08	28.07 \pm 4.53	29.45 \pm 4.89	0.002 ^{f,*}	0.048 ^a , 0.001 ^b , 0.444 ^c
Systolic BP, mmHg (median) (25th, 75th percentile)	130.00 (120.00, 140.00)	130.00 (125.00, 145.00)	140.00 (130.00, 140.00)	0.011 ^{d,*}	0.827 ^a , 0.035 ^b , 0.045 ^c
Diastolic BP, mmHg (median) (25th, 75th percentile)	80.00 (80.00, 90.00)	90.00 (80.00, 95.00)	80.00 (80.00, 90.00)	0.153 ^d	NA
Diabetes duration, years (median) (25th, 75th percentile)	NA	4.00 ^a (1.00, 9.00)	8.00 ^b (5.00, 16.00)	0.016 ^g	0.016 ^c
Fasting plasma glucose, mg/dL (mean \pm standard deviation)	98.49 \pm 9.65	126.84 \pm 26.92	210.09 \pm 71.86	<0.0005 ^{f,*}	0.021 ^a , <0.0005 ^{b,c}
HbA1c, % (mean \pm standard deviation)	5.58 \pm 0.22	6.28 \pm 0.38	9.03 \pm 1.60	<0.0005 ^{f,*}	0.007 ^a , <0.0005 ^{b,c}
Hypertension (n) (%)	4 (10.81)	26 (81.25)	17 (54.84)	<0.0005 ^{f,*}	NA
Obesity (n) (%)	6 (16.22)	8 (25.00)	12 (38.71)	0.108 ^e	NA
Nephropathy (n) (%)	2 (5.41)	1 (3.13)	3 (9.68)	0.539 ^e	NA
Retinopathy (n) (%)	1 (2.70)	7 (21.88)	8 (25.81)	0.019 ^{e,*}	NA

NA = not applicable.

^a Control versus controlled T2DM.

^b Control versus poorly controlled T2DM.

^c Controlled T2DM versus poorly controlled T2DM.

^d Kruskal–Wallis with Dunn multiple comparison test.

^e Chi-squared test.

^f One-way ANOVA with Tukey post hoc.

^g Mann–Whitney U Test.

* $P < 0.05$.

Table 2
Comparison of clinical and periodontal parameters.

Parameters	Groups			P value	
	Control (n = 37)	Controlled T2DM (n = 32)	Poorly controlled T2DM (n = 31)	Among groups	Between groups
Number of teeth (median) (25th, 75th percentile)	23.00 (13.00, 26.00)	16.00 (10.00, 23.50)	20.00 (11.00, 26.00)	0.286 ^d	NA
DMFT index (mean ± standard deviation)	18.86 ± 6.45	20.25 ± 6.70	18.23 ± 7.31	0.436 ^e	NA
DMFT component					
Decayed	0.00 (0.00, 1.00)	0.00 (0.00, 1.00)	1.00 (0.00, 2.00)	0.165 ^d	NA
Missing	7.00 (3.00, 16.00)	11.00 (4.50, 20.00)	9.00 (3.00, 17.00)	0.233 ^d	NA
Filled	9.00 (4.00, 13.00)	6.00 (2.00, 10.50)	7.00 (2.00, 10.00)	0.158 ^d	NA
Buffering capacity (mean ± standard deviation)	3.47 ± 1.23	4.09 ± 1.22	4.29 ± 1.33	0.022 ^{e,*}	0.114 ^a , 0.024 ^b , 0.793 ^c
Plaque index (%) (mean ± Standard deviation)	48.10 ± 21.37	59.46 ± 22.85	67.42 ± 22.64	0.002 ^{e,*}	0.092 ^a , 0.002 ^b , 0.335 ^c
BOP (%) (mean ± standard deviation)	35.79 ± 17.66	42.53 ± 19.14	52.82 ± 24.36	0.004 ^{e,*}	0.361 ^a , 0.003 ^b , 0.118 ^c
Sites with PD ≤ 3 mm (median) (25th, 75th percentile)	113.00 (71.00, 142.00)	76.50 (52.00, 121.50)	72.00 (43.00, 118.00)	0.108 ^d	NA
Sites with PD 4 mm (median) (25th, 75th percentile)	4.00 (1.00, 10.00)	5.00 (1.00, 9.00)	5.00 (1.00, 13.25)	0.793 ^d	NA
Sites with PD 5 to 6 mm (Median) (25th, 75th percentile)	1.00 (0.00, 7.00)	2.00 (0.00, 6.50)	2.50 (0.00, 17.00)	0.508 ^d	NA
Sites with PD ≥ 7 mm (median) (25th, 75th percentile)	0.00 (0.00, 1.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.45)	0.136 ^d	NA
Sites with CAL ≤ 3 mm (median) (25th, 75th percentile)	123.00 (71.00, 142.00)	78.00 (36.25, 112.50)	64.50 (35.75, 112.25)	0.008 ^{d,*}	0.592 ^a , 0.007 ^b , 0.444 ^c
Sites with CAL 4 mm (median) (25th, 75th percentile)	4.00 (1.00, 10.00)	9.50 (4.75, 17.00)	8.50 (3.75, 16.25)	0.021 ^{d,*}	0.002 ^a , 0.008 ^b , 0.896 ^c
Sites with CAL 5–6 mm (median) (25th, 75th percentile)	2.00 (0.00, 5.00)	7.00 (1.00, 14.00)	7.00 (2.75, 23.75)	0.002 ^{d,*}	0.002 ^a , 0.008 ^b , 0.896 ^c
Sites with CAL ≥ 7 mm (median) (25th, 75th percentile)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 2.00)	3.00 (0.00, 6.25)	0.002 ^{d,*}	0.998 ^a , 0.001 ^b , 0.002 ^c

NA = not applicable.

^a Control versus controlled T2DM.

^b Control versus poorly controlled T2DM.

^c Controlled T2DM versus poorly controlled T2DM.

^d Kruskal–Wallis with Dunn multiple comparison test.

^e One-way ANOVA with Tukey post hoc.

* $P < 0.05$.

parameters, but the plasma CHGA concentration was positively correlated with BOP ($r = 0.337$, $P = 0.041$). The concentration of salivary CHGA was positively correlated with the concentration of plasma CHGA ($r = 0.443$, $P = 0.006$). However, similar correlations have not been observed in T2DM patients.

In controlled T2DM group, there was no significant correlation between the concentration of plasma and salivary CHGA and the clinical and periodontal parameters.

In poorly controlled T2DM group, the concentration of salivary CHGA was positively correlated with plaque index ($r = 0.452$, $P = 0.011$), CAL 4 mm ($r = 0.441$, $P = 0.013$) and buffering capacity ($r = 0.533$, $P = 0.002$). Concerning the concentration of plasma CHGA, a positive correlation with DMFT index ($r = 0.430$, $P = 0.016$) and negative with CAL ≤ 3 mm ($r = -0.370$, $P = 0.040$) and CAL = 4 mm ($r = 0.392$, $P = 0.029$) were found.

With regard to the production of CHGA according to the periodontal parameters, the study subjects were distributed according to groups and also by the number of individuals stratified by the presence of one or more sites with the worst periodontal parameter, as shown in Table 3. The analysis of PD 5–6 mm showed that both diabetic groups had a significantly higher salivary CHGA levels than control group ($P = 0.010$). Similarly, when the CAL 5–6 mm is compared between groups, a significantly higher salivary CHGA concentration in both diabetic groups was observed ($P = 0.001$). There was no significant group difference when associated plasma CHGA levels with PD and CAL values.

4. Discussion

It is known that persistent hyperglycemia affects the oral health status, however this study partly confirmed this hypothesis. The three groups did not differ with respect to mean DMFT index. This observation is compatible with that of previous studies (Collin et al., 1998; Lin, Taylor, Allen, & Ship, 1999; Mohamed et al., 2013), which also demonstrated no difference between diabetic patients and control group, and this finding might be attributed to confounding factors such as xerostomia, periodontal disease and a strict carbohydrate diet in DM patients (Moore et al., 2001). In the controlled T2DM group, a positive correlation between duration of diabetes and DMFT index was noticed, this can be explained by previous studies that reported higher salivary glucose levels (Dorocka-Bobkowska, Budtz-Jorgensen, & Wloch, 1996; Vasconcelos, Soares, Almeida, & Soares, 2010), which can favor the proliferation of microorganisms (such as *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*) and enhance their colonization on teeth and oral mucous membranes.

The salivary buffering capacity is responsible for the maintenance of oral pH in order to guarantee tooth integrity and to inhibit acid production by bacterial biofilm (Moritsuka et al., 2006). All groups showed deficiency in buffering capacity, however, a lower mean value was found in control subjects than T2DM patients. This is in agreement with the findings of Kjellman (Kjellman, 1970), although some reports related the reduction of the buffering capacity in diabetic patients (Cristina de Lima et al., 2008; Hintao

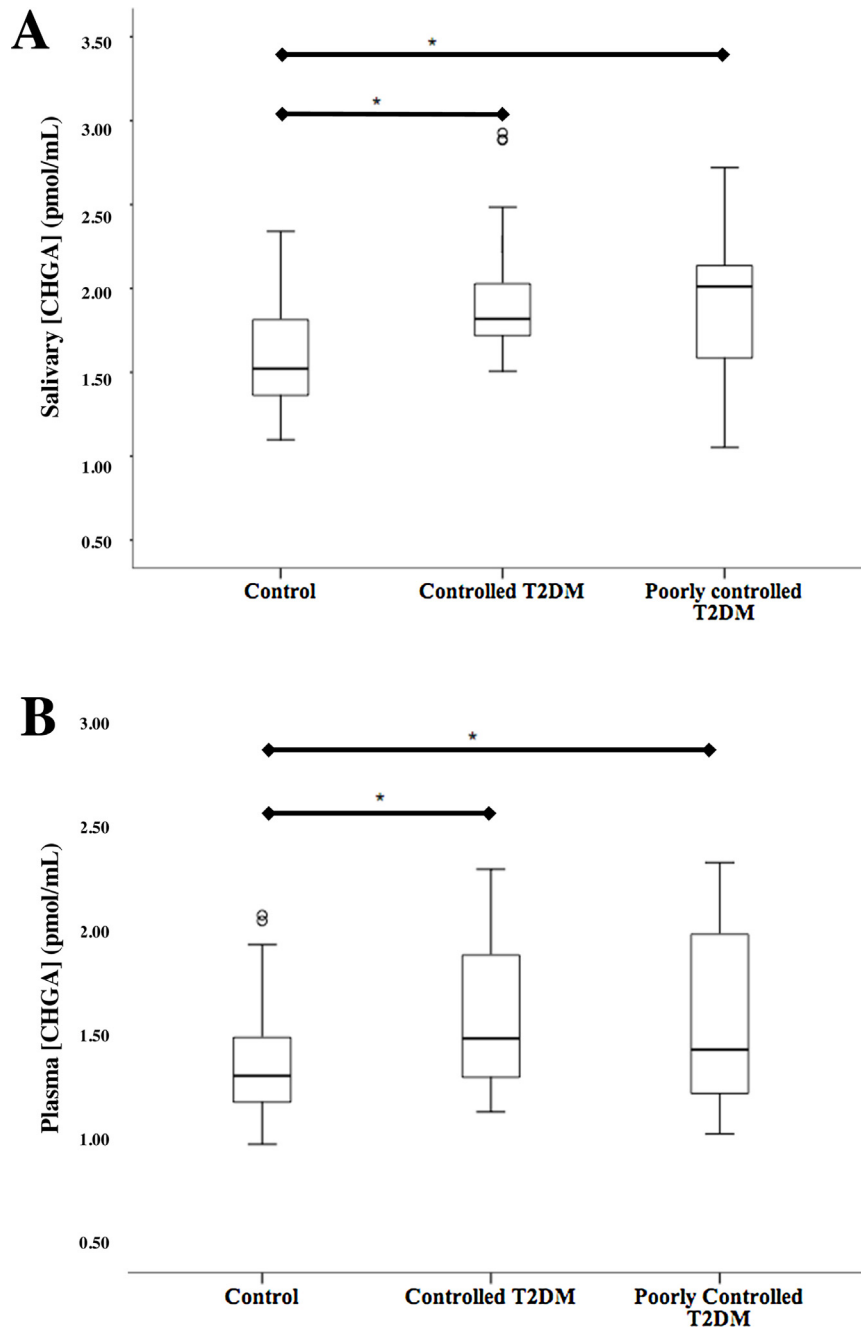


Fig. 1. Concentration of salivary and plasma CHGA (pmol/mL) in control, controlled T2DM and poorly controlled T2DM groups. (A) Salivary CHGA levels differed significantly in control compared to T2DM controlled and T2DM poorly controlled (Kruskal–Wallis with Dunn multiple comparison test, $P=0.001$). (B) Plasma CHGA levels differed significantly in control compared to controlled and poorly controlled T2DM groups (Kruskal–Wallis with Dunn multiple comparison test, $P=0.036$).

et al., 2007) and other no difference was observed from diabetic compared with the control group (Bernardi et al., 2007). Disagreements could be due to the use of colorimetric and electrometric methods to determine the salivary buffering capacity.

This present cross-sectional study provides evidence for an association between glycemic control and susceptibility for worst periodontal parameters. Our findings showed that T2DM and poor glycemic control increase the plaque index, bleeding on probing and worse periodontal condition, which matches with previous studies (Bridges et al., 1996; Campus, Salem, Uzzau, Baldoni, & Tonolo, 2005; Mohamed et al., 2013; Morton, Williams, & Watts, 1995). Unlike earlier data, T2DM groups showed higher levels of $PD \geq 4$ mm, however no significant difference was found between groups. Furthermore, our analysis found that CAL 4 and 5–6 mm

were significantly higher in both T2DM groups when compared to control group and individuals with T2DM poorly controlled had significantly higher sites with $CAL \geq 7$ mm than other groups. The prevalence difference between CAL and PD measurements occurs probably, at least in part, due to gingival recession. Since there was no significant difference between the three groups studied, according to prevalence of $PD > 4$ mm, we could suggest that the values of CAL might be more influenced by gingival recession than by PD or also by the influence that diabetes exerts on periodontal disease. It is important to point out that gingival recession usually increases with age, and in the current study, T2DM patients were older than the control group. Although there was no significant age difference among the groups, the controlled T2DM group had 65.63% of individuals over 55 years old and poorly controlled T2DM

Table 3
Comparison of median values for salivary and plasma chromogranin A (CHGA) according PD and CAL.

Parameters	Groups (n) ^d	Salivary CHGA (pmol/mL) median (25th, 75th percentile)	P value ^e (among groups)	P value ^e (between groups)	Plasma CHGA (pmol/mL) median (25th, 75th percentile)	P value ^e (among groups)	P value ^e (between groups)
PD ≤ 3 mm	Control (n = 3)	1.66 (1.36, 2.03)	0.398	NA	1.16 (1.09, 1.31)	0.046	NA
	Controlled T2DM (n = 4)	1.88 (1.78, 2.42)			1.47 (1.32, 1.77)		
	Poorly controlled T2DM (n = 2)	2.17 (1.90, 2.44)			2.10 (2.09, 2.12)		
PD 4 mm	Control (n = 10)	1.46 (1.30, 1.89)	0.188	NA	1.21 (1.07, 1.75)	0.132	NA
	Controlled T2DM (n = 5)	1.83 (1.81, 2.12)			1.77 (1.68, 2.10)		
	Poorly controlled T2DM (n = 8)	1.96 (1.61, 2.01)			1.91 (1.17, 2.13)		
PD 5–6 mm	Control (n = 13)	1.53 (1.42, 1.72)	0.010 ^f	0.010 ^a , 0.001 ^b , 0.352 ^c	1.29 (1.24, 1.49)	0.463	NA
	Controlled T2DM (n = 16)	1.86 (1.70, 2.03)			1.45 (1.26, 1.73)		
	Poorly controlled T2DM (n = 8)	2.11 (1.50, 2.18)			1.42 (1.24, 1.75)		
PD ≥ 7 mm	Control (n = 11)	1.51 (1.36, 2.12)	0.417	NA	1.44 (1.28, 1.73)	0.830	NA
	Controlled T2DM (n = 7)	1.72 (1.61, 1.75)			1.45 (1.22, 1.99)		
	Poorly controlled T2DM (n = 13)	2.05 (1.42, 2.07)			1.36 (1.21, 1.76)		
CAL ≤ 3 mm	Control (n = 3)	1.66 (1.36, 2.03)	0.276	NA	1.16 (1.09, 1.31)	0.102	NA
	Controlled T2DM (n = 3)	1.72 (1.67, 1.81)			1.47 (1.43, 1.68)		
	Poorly controlled T2DM (n = 1)	1.25 (1.25, 1.25)			1.44 (1.44, 1.44)		
CAL 4 mm	Control (n = 11)	1.46 (1.30, 1.89)	0.128	NA	1.22 (1.07, 1.75)	0.459	NA
	Controlled T2DM (n = 3)	2.88 (1.59, 2.93)			1.45 (1.21, 2.30)		
	Poorly controlled T2DM (n = 3)	1.41 (1.17, 2.09)			1.26 (1.26, 1.90)		
CAL 5–6 mm	Control (n = 14)	1.53 (1.42, 1.72)	0.001 ^f	0.025 ^a , 0.012 ^b , 0.123 ^c	1.33 (1.24, 1.49)	0.091	NA
	Controlled T2DM (n = 15)	1.91 (1.79, 2.10)			1.52 (1.44, 1.77)		
	Poorly controlled T2DM (n = 8)	1.96 (1.78, 2.17)			1.48 (1.30, 1.94)		
CAL ≥ 7 mm	Control (n = 9)	1.51 (1.36, 2.12)	0.247	NA	1.46 (1.38, 1.73)	0.882	NA
	Controlled T2DM (n = 11)	1.76 (1.65, 1.85)			1.28 (1.23, 2.04)		
	Poorly controlled T2DM (n = 19)	2.05 (1.78, 2.17)			1.43 (1.18, 2.24)		

N = not applicable.

^a Control versus controlled T2DM.

^b Control versus poorly controlled T2DM.

^c Controlled T2DM versus poorly controlled T2DM.

^d Number of patients with at least one site with the worst condition (PD or CAL).

^e Kruskal–Wallis with Dunn multiple comparison test.

^f $P < 0.05$.

group had 54.84% of them, while the control group had only 35.14%. According to some studies, it estimated a greater bone loss in patients over the age of 55 years and it was found that the most advanced age is significantly associated with periodontal disease severity (Cerda, Vázquez de la Torre, Malacara, & Nava, 1994; Choi et al., 2011).

Standard case definition of periodontal disease is a fundamental requirement for population-base surveillance of the disease. Nevertheless, the selection of threshold values is critical and no consensus has been reached towards the threshold values for PD and CAL or for the amount of sites or teeth that must be affected to identifying periodontal disease severity. Therefore, the present study did not use case definitions, but rather reported the data in

terms of PD, CAL and others clinical periodontal parameters, in order to analyze the periodontal status rather than the periodontal diagnosis.

Full mouth assessment of CAL represents a valid method for determining the overall periodontal status of a subject, indicating the degree of remaining tooth support. Since the present study adopted this criterion of examination, it is possible to evidence the impact of diabetes on the periodontal tissue damage. The significant association with periodontal parameters for both T2DM groups was consistent with previous studies when compared with the nondiabetic controls (Khader, Albashaireh, & Hammad, 2008; Tsai, Hayes, & Taylor, 2002; Susanto et al., 2012). Taylor et al. (1998) reported that subjects with type 2 diabetes had

a 4-fold greater risk for more severe alveolar bone loss progression. A report by [Bandyopadhyay, Marlow, Fernandes and Leite \(2010\)](#), using a study population of Gullah African Americans with T2DM and no recent clinical history of periodontal therapy, concluded that there are significant associations between periodontal disease progression and diabetes control status. Overall, this relationship between T2DM and periodontal disease have been based on the fact that inflammatory periodontal disease due to reaction to pathogenic biofilm stimulates a chronic systemic inflammation and thus contributes to the cumulative inflammatory burden in the host ([Loos, 2005](#); [Renvert, Pettersson, Ohlsson, & Persson, 2006](#)). Persistent hyperglycemia leads to an exaggerated immune-inflammatory response that precedes diabetes onset ([Duncan & Schmidt, 2006](#); [Duncan et al., 1999](#); [Schmidt et al., 1999](#)) and is linked to insulin resistance and development of diabetes ([Wang et al., 2013](#)) as well as its complications ([King, 2008](#)).

CHGA is reported to be overexpressed in saliva of type 2 diabetic patients ([Soell et al., 2010](#)). In agreement with this previous finding, the data from the present study demonstrated a significantly higher CHGA concentration in both plasma and saliva in diabetic groups, regardless the glycemic control. It is known that protein CHGA is the source of the dysglycemic peptide pancreastatin (PST) ([Taupeot et al., 2003](#)), which antagonizes the effects of insulin on glucose and lipid metabolism coupled with its inhibitory effect on insulin secretion; it is hypothesized that PST plays a crucial role in the development of insulin resistance. This hypothesis is supported by the observation that PST levels rise in T2DM ([Funakoshi, Tateishi, Shinozaki, Matsumoto, & Wakasugi, 1990](#); [O'Connor et al., 2005](#)). Nonetheless, the exact role of PST in the pathogenesis of the insulin-resistance and T2DM remains to be elucidated.

In addition, no significant association were found between plasma CHGA levels and periodontal parameters in T2DM groups, despite in control group, the plasma CHGA concentration was positively correlated with BOP, and this could be explained because the selection criteria for this group consisted in individuals without diabetes regardless the periodontal status.

Among periodontal parameters and the salivary CHGA concentration within the groups analyzed, PD 5–6 mm and CAL 5–6 mm were significantly associated with increased salivary CHGA levels in T2DM groups. This difference can be explained by the CHGA be produced by endocrine cells in the striated ducts of human salivary glands ([Dag et al., 2010](#)). Previous reports also demonstrated a positive association between salivary CHGA and extent of periodontitis and infer this association with psychological stress; however, these studies evaluated patients without systemic diseases ([Haririan et al., 2012](#); [Hironaka et al., 2008](#); [Rai et al., 2011](#)). In the present study, the highest levels of salivary CHGA in T2DM patients with periodontitis may be either attributable to the alteration of neuroendocrine immune functions and the reaction of the nervous system interpreting immune activation as a stressor or linked to a higher systemic stress loading and inflammatory pathways known to affect glucose metabolism.

The essential role of bacteria in periodontitis was established in several studies but bacteria alone seem to be insufficient to explain occurrence or progression of the disease. Diabetes and psychological stress have been identified as important risk factors for periodontitis. Diabetes has many adverse effects that may contribute to the development or progression of periodontitis, including vascular changes, impaired neutrophil function, decreased collagen turnover, genetic predisposition dysfunction, and changes in gingival microbiota. In the biochemical aspect, there is an intimate relationship between the time in which the body was exposed to hyperglycemia and the formation of advanced glycation end products (AGEs) ([Ahmed & Thornalley, 2007](#)). The putative theory is that the accumulation of AGEs induces the formation of

proinflammatory cytokines (such as interleukin IL-1 β) in hyperglycemia, and the cytokine-induced low-grade inflammation plays an essential role in the development of insulin resistance and it is involved in the destructive process of periodontitis. Likewise, periodontal pathogens secrete endotoxin that may increase the amount of inflammation markers, such as C-reactive protein, TNF- α and IL-6. These cytokines, particularly TNF- α and IL-6 are causing increased insulin resistance. Thus, with low insulin sensitivity, the production of C-reactive protein occurs. This leads to the destruction of pancreatic β cells through apoptosis by interfering negatively with glycemic control. Thereafter, it is clear bidirectional relationship between diabetes mellitus and periodontal disease ([Mealey & Ocampo, 2007](#); [Schmidt et al., 1996](#); [Stern, Yan, Yan, & Schmidt, 2002](#)).

Stress is regarded as a cognitive perception of uncontrollability and/or unpredictability that is expressed in a physiological and behavioral response ([Koolhaas et al., 2011](#)). The possible mechanisms that psychological stress affects directly on periodontal health are biological, such as gingival circulation, alteration in salivary components and flow, hormonal changes and lowered host resistance. And indirectly are oral hygiene negligence, smoking, bruxism, consuming more fat and sugar in diet ([LeResche & Dworkin, 2002](#)).

In response to stressful events, the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis is stimulated by the anterior hypothalamus leading to secretion of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin that act on the pituitary gland. This gland releases adrenocorticotrophic hormone that acts on the adrenal cortex and increases production and release of cortisol, a glucocorticoid hormone that stimulates immune responses ([Tsigos & Chrousos, 2002](#)). The autonomous nervous system (ANS) is stimulated by adrenergic receptors leading to secretion of catecholamines (adrenalin/noradrenalin) and CHGA by adrenal medulla and sensory nerve fibers. Catecholamines regulate the immune response by stimulation of immune cell proliferation and activity ([Hamaguchi et al., 2008](#); [Sanders & Straub, 2002](#)), while CHGA or its derivate peptides is also related to the systemic and local immunomodulation systems, being involved in antimicrobial peptide production, mast cell migration, leukotriene and prostaglandin production, and histamine release ([Helle, 2010](#)). These effects that disrupt homeostasis and lead to increased susceptibility to periodontal diseases.

Furthermore, some studies have investigated associations between psychosocial factor and DM development and prognosis. Adverse psychosocial factors stimulate the HPA and the ANS, resulting in increased release of cortisol, adrenaline and neuropeptide Y. Cortisol is a stress hormone that triggers glucose production, increases lipolysis and circulating nonesterified fatty acids, decreases insulin secretion from beta cells and decreases sensitivity to insulin ([Lundberg, 2005](#); [Bhathena, 2006](#)). Adrenaline has similar effects to cortisol on glucose and fat metabolism ([Lundberg, 2005](#); [Bhathena, 2006](#)), and neuropeptide Y may mediate stress-induced obesity and the metabolic syndrome by increasing adipogenesis and lipolysis ([Kuo et al., 2007](#)), thereby resulting in poor control of diabetes.

The findings of this study revealed a significant relationship between type 2 diabetes, periodontal alterations and CHGA concentration, suggesting for the first time that CHGA levels were higher in T2DM groups with PD and CAL 5–6 mm. In some aspects no significant differences were seen between controlled and uncontrolled diabetics, however it is unclear if the increase is due to DM, periodontitis or both, since both conditions can altered the CHGA levels.

The findings are limited by the sample size and the cross-sectional design of the study therefore this cannot be used to determine the direction of causality or temporal sequence.

Additional prospective studies are needed to examine associations between CHGA with psychological stress, diabetes risk, periodontal disease in populations without any diagnosed diabetes and periodontal disease.

5. Conclusion

In summary, this present study revealed that the range of clinical attachment loss ≥ 4 – ≤ 6 mm was more prevalent in T2DM patients as compared to nondiabetic subjects. In addition, the study provides evidences that the clinical attachment loss is more pronounced in those with poor glycemic control in T2DM (CAL ≥ 7 mm). On the other hand, no difference was found in the DMFT scores between T2DM groups and control group. Moreover, the results suggest that high concentration of salivary CHGA are associated with worse periodontal parameters and T2DM, and this could be related to the pathogenesis of both diseases.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

Sources of funding

This study was partly supported by grants from the Universidade de Brasília (DPP 10/2011) and Universidade Católica de Brasília (UCB).

Ethical approval

This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by Ethics Committee of Universidade Católica de Brasília (Protocol #160/11), Brasília-DF, Brazil.

Acknowledgments

The present study would not have been possible without the participation of the patients and healthy volunteers. The authors also would like to thank Isabel Cristina Marques Fensterseifer, Larissa Bittencourt, Selma Soares Nascimento, Diego Batista da Silva and Poliana Amanda Oliveira Silva for their excellent help with the experiments.

References

- Ahmed, N., & Thornalley, P. J. (2007). Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9(3), 233–245.
- Ainamo, J., & Bay, I. (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal*, 25, 229–235.
- American Diabetes A (2014). Standards of medical care in diabetes—2014. *Diabetes Care*, 37(Suppl. 1), S14–80.
- Bandyopadhyay, D., Marlow, N. M., Fernandes, J. K., & Leite, R. S. (2010). Periodontal disease progression and glycaemic control among Gullah African Americans with type-2 diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(6), 501–509.
- Bernardi, M. J., Reis, A., Loguercio, A. D., Kehrig, R., Leite, M. F., & Nicolau, J. (2007). Study of the buffering capacity, pH and salivary flow rate in type 2 well-controlled and poorly controlled diabetic patients. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 5(1), 73–78.
- Bhathena, S. J. (2006). Relationship between fatty acids and the endocrine and neuroendocrine system. *Nutritional Neuroscience*, 9(1–2), 1–10.
- Bouchard, P., Boutouyrie, P., Mattout, C., & Bourgeois, D. (2006). Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *Journal of Periodontology*, 77(3), 479–489.
- Bridges, R. B., Anderson, J. W., Saxe, S. R., Gregory, K., & Bridges, S. R. (1996). Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *Journal of Periodontology*, 67(11), 1185–1192.
- Campus, G., Salem, A., Uzzau, S., Baldoni, E., & Tonolo, G. (2005). Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *Journal of Periodontology*, 76(3), 418–425.
- Cerda, J., Vázquez de la Torre, C., Malacara, J. M., & Nava, L. E. (1994). Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). The effect of age and time since diagnosis. *Journal of Periodontology*, 65(11), 991–995.
- Chavez, E. M., Taylor, G. W., Borrell, L. N., & Ship, J. A. (2000). Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 89(3), 305–311.
- Choi, Y. H., McKeown, R. E., Mayer-Davis, E. J., Liese, A. D., Song, K. B., & Merchant, A. T. (2011). Association between periodontitis and impaired fasting glucose and diabetes. *Diabetes Care*, 34(2), 381–386.
- Collin, H. L., Uusitupa, M., Niskanen, L., Koivisto, A. M., Markkanen, H., & Meurman, J. H. (1998). Caries in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 85(6), 680–685.
- Cristina de Lima, D., Nakata, G. C., Balducci, I., & Almeida, J. D. (2008). Oral manifestations of diabetes mellitus in complete denture wearers. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 99(1), 60–65.
- Dag, E., Aydin, S., Ozkan, Y., Erman, F., Dagli, A. F., & Gurger, M. (2010). Alteration in chromogranin A, obestatin and total ghrelin levels of saliva and serum in epilepsy cases. *Peptides*, 31(5), 932–937.
- Darre, L., Vergnes, J. N., Gourdy, P., & Sixou, M. (2008). Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: a meta-analysis of interventional studies. *Diabetes & Metabolism*, 34(5), 497–506.
- Dorocka-Bobkowska, B., Budtz-Jorgensen, E., & Wloch, S. (1996). Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 25(8), 411–415.
- Duncan, B. B., & Schmidt, M. I. (2006). The epidemiology of low-grade chronic systemic inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 8(1), 7–17.
- Duncan, B. B., Schmidt, M. I., Offenbacher, S., Wu, K. K., Savage, P. J., & Heiss, G. (1999). Factor VIII and other hemostasis variables are related to incident diabetes in adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes Care*, 22(5), 767–772.
- Edgar, W. M. (1992). Saliva its secretion, composition and functions. *British Dental Journal*, 172(8), 305–312.
- Falcao, D. P., Leal, S. C., Vieira, C. N., Wolff, A., Almeida, T. F., Nunes Fde, P., et al. (2014). Sialometry of upper labial minor glands: a clinical approach by the use of weighing method Schirmer's test strips paper. *The Scientific World Journal*, 2014, 268634.
- Funakoshi, A., Tateishi, K., Shinozaki, H., Matsumoto, M., & Wakasugi, H. (1990). Elevated plasma levels of pancreastatin (PST) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Regulatory Peptides*, 30(2), 159–164.
- Gonzalez-Yanes, C., & Sanchez-Margalet, V. (2000). Pancreastatin modulates insulin signaling in rat adipocytes: mechanisms of cross-talk. *Diabetes*, 49(8), 1288–1294.
- Hamaguchi, T., Fukudo, S., Kanazawa, M., Tomiie, T., Shimizu, K., Oyama, M., et al. (2008). Changes in salivary physiological stress markers induced by muscle stretching in patients with irritable bowel syndrome. *BioPsychoSocial Medicine*, 2, 20.
- Haririan, H., Bertl, K., Laky, M., Rausch, W. D., Bottcher, M., Matejka, M., et al. (2012). Salivary and serum chromogranin A and alpha-amylase in periodontal health and disease. *Journal of Periodontology*, 83(10), 1314–1321.
- Helle, K. B. (2010). Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(8), 1145–1146.
- Hintao, J., Teanpaisan, R., Chongsuvivatwong, V., Dahlen, G., & Rattarasarn, C. (2007). Root surface and coronal caries in adults with type 2 diabetes mellitus. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 35(4), 302–309.
- Hironaka, M., Ansai, T., Soh, I., Ishisaka, A., Awano, S., Yoshida, A., et al. (2008). Association between salivary levels of chromogranin A and periodontitis in older Japanese. *Biomedical Research*, 29(3), 125–130.
- Janket, S. J., Wightman, A., Baird, A. E., Van Dyke, T. E., & Jones, J. A. (2005). Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *Journal of Dental Research*, 84(12), 1154–1159.
- Jawed, M., Shahid, S. M., Qader, S. A., & Azhar, A. (2011). Dental caries in diabetes mellitus: role of salivary flow rate and minerals. *Journal of Diabetes Complications*, 25(3), 183–186.
- Khader, Y. S., Albashaireh, Z. S., & Hammad, M. M. (2008). Periodontal status of type 2 diabetics compared with nondiabetics in north Jordan. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 14(3), 654–661.
- King, G. L. (2008). The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of Periodontology*, 79(Suppl. 8), 1527–1534.
- Kjellman, O. (1970). Secretion rate and buffering action of whole mixed saliva in subjects with insulin-treated diabetes mellitus. *Odontol Revy*, 21(2), 159–168.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flugge, G., Korte, S. M., et al. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(5), 1291–1301.
- Kuo, L. E., Kitlinska, J. B., Tilan, J. U., Li, L., Baker, S. B., Johnson, M. D., et al. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature Medicine*, 13(7), 803–811.
- LeResche, L., & Dworkin, S. F. (2002). The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontology 2000*, 30, 91–103.

- Leung, W. K., Siu, S. C., Chu, F. C., Wong, K. W., Jin, L., Sham, A. S., et al. (2008). Oral health status of low-income, middle-aged to elderly Hong Kong Chinese with type 2 diabetes mellitus. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 6(2), 105–118.
- Lin, B. P., Taylor, G. W., Allen, D. J., & Ship, J. A. (1999). Dental caries in older adults with diabetes mellitus. *Special Care in Dentistry*, 19(1), 8–14.
- Loe, H. (1993). Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 16(1), 329–334.
- Loos, B. G. (2005). Systemic markers of inflammation in periodontitis. *Journal of Periodontology*, 76(Suppl. 11), 2106–2115.
- Lundberg, U. (2005). Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. *Psychoneuroendocrinology*, 30(10), 1017–1021.
- Mealey, B. L., & Ocampo, G. L. (2007). Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology* 2000, 44, 127–153.
- Mohamed, H. G., Idris, S. B., Ahmed, M. F., Boe, O. E., Mustafa, K., Ibrahim, S. O., et al. (2013). Association between oral health status and type 2 diabetes mellitus among Sudanese adults: a matched case–control study. *PLoS One*, 8(12), e82158.
- Moore, P. A., Guggenheimer, J., Etzel, K. R., Weyant, R. J., & Orchard, T. (2001). Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 92(3), 281–291.
- Moore, P. A. (2002). The diabetes–oral health connection. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 23(Suppl. 12), 14–20.
- Moritsuka, M., Kitasako, Y., Burrow, M. F., Ikeda, M., Tagami, J., & Nomura, S. (2006). Quantitative assessment for stimulated saliva flow rate and buffering capacity in relation to different ages. *Journal of Dentistry*, 34(9), 716–720.
- Morton, A. A., Williams, R. W., & Watts, T. L. (1995). Initial study of periodontal status in non-insulin-dependent diabetics in Mauritius. *Journal of Dentistry*, 23(6), 343–345.
- O'Connor, D. T., & Bernstein, K. N. (1984). Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *The New England Journal of Medicine*, 311(12), 764–770.
- O'Connor, D. T., Cadman, P. E., Smiley, C., Salem, R. M., Rao, F., Smith, J., et al. (2005). Pancreastatin: multiple actions on human intermediary metabolism in vivo, variation in disease, and naturally occurring functional genetic polymorphism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(9), 5414–5425.
- Preshaw, P. M., Alba, A. L., Herrera, D., Jepsen, S., Konstantinidis, A., Makrilakis, K., et al. (2012). Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, 55(1), 21–31.
- Rai, B., Kaur, J., Anand, S. C., & Jacobs, R. (2011). Salivary stress markers, stress, and periodontitis: a pilot study. *Journal of Periodontology*, 82(2), 287–292.
- Renvert, S., Pettersson, T., Ohlsson, O., & Persson, G. R. (2006). Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome. *Journal of Periodontology*, 77(7), 1110–1119.
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 20(7), 1183–1197.
- Sanders, V. M., & Straub, R. H. (2002). Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(4), 290–332.
- Saruta, J., Tsukinoki, K., Sasaguri, K., Ishii, H., Yasuda, M., Osamura, Y. R., et al. (2005). Expression and localization of chromogranin A gene and protein in human submandibular gland. *Cells Tissues Organs*, 180(4), 237–244.
- Schmidt, A. M., Weidman, E., Lalla, E., Yan, S. D., Hori, O., Cao, R., et al. (1996). Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *Journal of Periodontal Research*, 31(7), 508–515.
- Schmidt, M. I., Duncan, B. B., Sharrett, A. R., Lindberg, G., Savage, P. J., Offenbacher, S., et al. (1999). Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*, 353(9165), 1649–1652.
- Simpson, T. C., Needleman, I., Wild, S. H., Moles, D. R., & Mills, E. J. (2010). Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes. *Cochrane Database System Review*, 5, CD004714.
- Soell, M., Feki, A., Hannig, M., Sano, H., Pinget, M., & Selimovic, D. (2010). Chromogranin A detection in saliva of type 2 diabetes patients. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 10(1), 2–8.
- Soni, S., Mehta, M. M. A. D., Pallavi, P. R., Kadanakuppe, S., et al. (2014). Root caries among type 2 diabetes mellitus patients visiting a hospital. *Special Care in Dentistry*, 34(6), 273–277.
- Stern, D. M., Yan, S. D., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2002). Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Research Reviews*, 1(1), 1–15.
- Susanto, H., Nesse, W., Dijkstra, P. U., Hoedemaker, E., van Reenen, Y. H., Agustina, D., et al. (2012). Periodontal inflamed surface area and C-reactive protein as predictors of HbA1c: a study in Indonesia. *Clinical Oral Investigations*, 16(4), 1237–1242.
- Tatemoto, K., Efendic, S., Mutt, V., Makk, G., Feistner, G. J., & Barchas, J. D. (1986). Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature*, 324(6096), 476–478.
- Taupenot, L., Harper, K. L., & O'Connor, D. T. (2003). The chromogranin–secretogranin family. *The New England Journal of Medicine*, 348(12), 1134–1149.
- Taylor, G. W. (2003). The effects of periodontal treatment on diabetes. *The Journal of the American Dental Association*, 134, Spec No: 41S–8S.
- Taylor, G. W., Burt, B. A., Becker, M. P., Genco, R. J., Shlossman, M., Knowler, W. C., et al. (1998). Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *Journal of Periodontology*, 69(1), 76–83.
- Taylor, J. J., Preshaw, P. M., & Lalla, E. (2013). A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Periodontology*, 84(Suppl. 4), S113–S134.
- Teeuw, W. J., Gerdes, V. E., & Loos, B. G. (2010). Effect of periodontal treatment on glycaemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(2), 421–427.
- Tsai, C., Hayes, C., & Taylor, G. W. (2002). Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 30(3), 182–192.
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(4), 865–871.
- Vasconcelos, A. C., Soares, M. S., Almeida, P. C., & Soares, T. C. (2010). Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. *Journal of Oral Science*, 52(2), 293–298.
- Wang, X., Bao, W., Liu, J., Ouyang, Y. Y., Wang, D., Rong, S., et al. (2013). Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 36(1), 166–175.
- Zheng, A., & Moritani, T. (2008). Effect of the combination of ginseng, oriental bezoar and glycyrrhiza on autonomic nervous activity and immune system under mental arithmetic stress. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 54(3), 244–249.

Manuscrito 2: Salivary function impairment in Type 2 Diabetes patients associated with concentration and genetic polymorphisms of chromogranin A

Enviado e revisado na revista Clinical Oral Investigations

Fator de Impacto: 2.352

Extrato Capes: B2 (Medicina I)

Clinical Oral Investigations Editorial Manager
HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS
Role: Author Username: evelynmikaela

Revisions Being Processed for Author Evelyn Mikaela Kogawa, M.D.

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
View Submission Author Response View Reference Checking Results	CLOI-D-15-00204R1	Salivary function impairment in Type 2 Diabetes patients associated with concentration and genetic polymorphisms of chromogranin A	25 Aug 2015	26 Aug 2015	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)

Display 10 results per page.

Salivary function impairment in Type 2 Diabetes patients associated with concentration and genetic polymorphisms of chromogranin A

Short running title: Saliva and chromogranin A in Type 2 Diabetes

Evelyn Mikaela Kogawa^{1,2}, Daniela Corrêa Grisi², Denise Pinheiro Falcão da Rocha¹, Ingrid Aquino Amorim³, Taia Maria Berto Rezende^{2,3,4}, Izabel Cristina Rodrigues da Silva⁵, Osmar Nascimento Silva⁴, Octávio Luiz Franco^{4,6,7}, Rivadávio Fernandes Batista de Amorim¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

²Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

⁴Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

⁵FCE, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

⁶Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biotecnologia e Genética), Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

⁷Programa de Doutorado da Rede Centro-Oeste, Brasília, DF, Brazil

⁸S-Inova, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

Corresponding author:

Evelyn Mikaela Kogawa

Telephone: +55 (061) 3356-9612

Universidade Católica de Brasília

QS 07 lote 01 EPCT Campus I Bloco S – sala S213

Bairro: Águas Claras - CEP: 71966-700

Taguatinga/DF, Brazil.

e-mail: mikaela.kogawa@gmail.com

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the effect of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) on salivary function impairments according to glycemic control status and subsequently compare the concentration of chromogranin A (CHGA) with its genetic profile.

Materials and methods: 36 patients with controlled T2DM, 36 with poorly controlled T2DM and 38 nondiabetic subjects underwent salivary flow rate measurements by means of unstimulated labial (ULS), unstimulated whole (UWS) and stimulated whole (SWS) saliva collections. CHGA concentrations were determined in saliva and plasma with ELISA, and two

CHGA polymorphisms (T-415C and Glu264Asp) were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

Results: T2DM patients presented significantly lower ULS and UWS flow rates regardless of glycemic control status compared to controls ($P=0.002$ and $P=0.027$, respectively). The SWS flow rate in the poorly controlled T2DM was the lowest among the groups ($P=0.026$). Significantly higher plasma and salivary CHGA levels were found in T2DM groups ($P=0.019$ and $P<0.001$, respectively). CHGA gene variants (T-415C and Glu264Asp) revealed significant differences between diabetics and control subjects when associated with lower salivary flow and higher salivary CHGA production ($P<0.05$).

Conclusions: T2DM causes abnormalities in the function of salivary glands. However, poorly controlled T2DM has the most influence on SWS flow rates. Our findings indicate an association between plasma and salivary CHGA levels and T2DM patients. Furthermore, the results suggest that CHGA polymorphisms might be associated with salivary gland hypofunction and higher salivary CHGA production in T2DM patients. Nevertheless, further epidemiological studies are required to elucidate this clinical implication.

Clinical Relevance: Salivary impairments and high levels of CHGA are associated with T2DM patients. In addition, CHGA polymorphisms might be associated with salivary gland hypofunction and higher salivary CHGA production in T2DM patients. This could be a significant insight to establish a role for salivary CHGA as a potential clinical biomarker to T2DM.

Keywords: [Type 2 diabetes](#), [chromogranin A](#), [saliva](#), [polymorphism](#), [genetic](#)

INTRODUCTION

Many biomarkers have been found in saliva, and some studies have documented the clinical value of measurements of chromogranin A (CHGA) as a marker for neuroendocrine cells associated diseases, vascular diseases, diabetes and others [1-3].

Chromogranin A is an acidic phosphorylated secretory glycoprotein belonging to the granin family found in various neuroendocrine tissues. CHGA is co-secreted with catecholamines from the adrenal medulla by the sympathetic nerve endings and the submandibular salivary glands [4], and it has proven useful as a biological marker of sympathetic nerve activity [5]. In addition to its intracellular functions, CHGA is cleaved through a post-translational proteolytic processing and gives rise to bioactive peptides including the diabetogenic pancreastatin (human CGHA₂₅₀₋₃₀₁), whose actions include inhibition of glucose-stimulated insulin release from pancreatic islet β -cells [6] as well as inhibition of glucose uptake by adipocytes and hepatocytes [7]. For this reason, it has been suggested that CHGA could contribute to the development of insulin resistance. Nevertheless, the role of CHGA as a potential marker for Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) has not been found in the current literature.

Nowadays, T2DM has become an important public health problem affecting thousands of people and further causing disability and premature mortality; it is also extremely cost effective due to control and management of complications [8]. It is well known that T2DM is characterized by chronic hyperglycemia as a result of impaired insulin action. Frequent states of chronic hyperglycemia can lead to various systemic changes [9,10] and oral complications [11] depending on the glycemic control level of the patient.

Diabetes is probably the most frequent chronic metabolic disease with salivary implications [12], such as xerostomia and hyposalivation [13,14,12,15-18]. These impairments result from autonomic neuropathy and microvascular disease complications, characteristics of the disease itself [19,20]. It is known that the salivary glands respond to stimuli from the autonomic nervous system [19] and salivary CHGA is a valuable indicator of sympathoadrenal activity [21,22]. Although a previous study has found an overexpression of CHGA in the saliva of T2DM patients [3], thus far there are no studies describing the relationship between CHGA and T2DM patients with regard to salivary dysfunctions, nor evaluating the CHGA genetic profile. Thus, this study aims to evaluate the potential effects of T2DM on salivary function impairments according to glycemic control status and subsequently compare the CHGA concentration with its genetic profile among T2DM patients (controlled and poorly controlled) and nondiabetic subjects.

SUBJECTS AND METHODS

Study population

The study population consisted of nondiabetic individuals and T2DM patients who were referred to the Integrated Dental Clinic at Universidade Católica de Brasília, recruited consecutively in the period between August 2011 and December 2013. Initially, a total of 309 diabetic participants completed a medical and dental history questionnaire. The inclusion criteria were adult males or females from 34 to 70 years of age, voluntary participation and confirmed diagnosis of T2DM. Fifty-five nondiabetic controls were recruited according to the same criteria except for being diagnosed with DM. Exclusion criteria for all groups included transplanted and/or epileptic; pregnancy; mental diseases; use of anti-inflammatory and/or antibiotic medication within the last 3 months; use of electronic devices such as pacemakers; insulin pumps and brain drain; difficulty of coordination; presence of oral and facial lesions suspected of malignancy; illicit drug users; presence of systemic conditions that could influence the salivary glands' physiology, such as hypothyroidism, history of radiotherapy in the head and neck regions, chemotherapy in the preceding 3 months. Of the initial group, 254 participants were excluded; the causes of the dropout were exclusion owing to inadequate data (n=49), after being screened for the exclusion criteria used (n=107), refusal to participate (n=41) and pairing between the age groups (n=57).

All participants were instructed to fast for a minimum of 8 hours prior to tests for fasting plasma glucose (FPG) (milligrams per deciliter) and glycated hemoglobin (HbA1c; percentage). T2DM patients were divided into two groups according to their glycemic control

levels, based on criteria given by the American Diabetes Association [23]. The HbA1c test was undertaken to determine the level of glycemic control, performed at less than three months before the saliva collection period. Individuals with well-controlled diabetes were defined as those with HbA1C < 7%, whereas subjects with HbA1C \geq 7% were categorized as poorly controlled.

A sample size of 28 patients in each group was calculated to detect a 0.34 pmol/mL in CHGA difference between groups (standard deviation intra group equal to 0.25 pmol/mL) with a 0.05 level of significance (two-tailed) and 80% power (based on preliminary data – pilot study, data not shown). As a result, a total of 110 age- and sex-matched subjects were evaluated and separated into three groups: 38 control subjects, 36 patients with glycemic controlled T2DM and 36 patients with poorly controlled T2DM.

Prior to testing, each subject had undergone routine general clinical examination which includes sociodemographic data, assessment of general health issues such as diabetes control, illness duration, family history, lifestyle, smoking status, alcohol consumption, medications usage and specific questions related to oral dryness. Anthropometric assessment included measurements of weight (kg) and height (m) for the calculation of body mass index (BMI).

All individuals enrolled in this study signed an informed consent form after obtaining a full explanation of the research procedures. The research protocol was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki principles and approved by the Ethics Committee of Universidade Católica de Brasília (Protocol #160/11), Brazil.

Sialometry

All saliva secretion rates were measured in the morning, between 8 a.m. and 11 a.m., to minimize the effect of circadian rhythms. The participating subjects were instructed not to eat, drink, smoke, or perform any oral hygienic procedures for at least 2 h prior to the measurements to prevent any kind of contamination in the saliva samples.

Measurement of unstimulated upper labial salivary gland flow rate (ULS)

The unstimulated upper labial salivary gland (ULS) flow rate was measured using a weighting method with Schirmer's paper strips test (Ophthalmos Industries, São Paulo, SP, Brazil), as described in the literature [24]. The total area of the Schirmer strip was 3 cm², so the value of the secretion rate found was divided by 3 to obtain a measurement unit that corresponds to $\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$. Values < 3.94 $\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$ were designated as hyposalivation.

Measurement of unstimulated whole salivary flow rate (UWS)

The UWS was measured by the draining method [24]. The patient was instructed to allow saliva to flow from the mouth into a pre-weighed sterile collector for 5 minutes. The collector was reweighed and subtracted from the initial weight, thus the collected volume was

divided by the collecting time to establish the secretion pattern of the patient (mL/min). Values < 0.10 mL/min were designated as hyposalivation.

Measurement of stimulated whole salivary flow rate (SWS)

The SWS was obtained by mechanical stimulation method [24]. The patient was instructed to chew a sterilized cylindrical silicone device (1 cm in length and 5mm in diameter) tied to a dental floss over a '5-min' period and all the saliva produced was spit into a sterile collector. Thereafter, flow rates were calculated and values < 0.70 mL/min were designated as hyposalivation.

Blood collection

Peripheral blood samples were obtained from each participant using an EDTA tube (BD., Franklin Lakes, NJ, USA) after the saliva tests to minimize alterations of salivary biomarkers attributable to possible anxious reactions to the blood collection.

Processing of samples

Volumes of stimulated saliva were placed in 15 mL Falcon tubes (*BD Biosciences*, San Jose, CA, USA). Blood and stimulated saliva samples were centrifuged at 1620 x g for 5 min at 4° C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG mark Hamburg, Germany) and immediately aliquoted and frozen at -80° C until analysis.

Chromogranin A analysis

Plasma and salivary CHGA concentration

Concentration of CHGA in plasma and stimulated saliva (pmol/mL) were determined using the YK070 Chromogranin A (Human) EIA kit (Yanaihara Institute Inc., Japan) with a lower sensitivity limit of 0.01 pmol/mL, according to the manufacturer's recommendations. The saliva sample was also measured as absolute amounts, i.e., the amount secreted into the oral cavity per minute, to determine output (mean flow rate and concentration values were multiplied).

Single nucleotide polymorphism assays

Genomic DNA was extracted from the peripheral blood leukocytes using NucleoSpin Blood QuickPure kit (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Duren, Germany). Two CHGA polymorphisms, including rs9658635 in the promoter region and Glu264Asp in exon 6 and rs9658655 were analyzed, using certain primers (rs9658635: Forward-5'CCTAGATATTGGAGAGAGCCATGAGTGA 3' and Reverse-5'CCATGTGTACTGAGGTCCCTGGCAG 3'; rs9658655: Forward-5'AGGGTGGCAGGCAAAGAG 3'and Reverse-5' AAGGTGGAATGAGGTTATGG 3'). After confirming successful PCR amplification, each product was digested at 37°C overnight with 5 U Bcc I or BfuC I restriction enzymes (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). For

the rs9658635 polymorphism restriction fragments were 114 and 21 bp for the T allele and 135 bp for the C allele. For the Glu264Asp polymorphism restriction fragments were 129 and 106 bp for the G allele, and 235 bp for the C allele [25].

Statistical Analysis

All data were analyzed using IBM SPSS Statistics version 20.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA). Demographic variables and clinical parameters were presented as the mean±SD or median and percentiles in each group. Continuous variables were tested for normal distribution by the Shapiro-Wilk test. Comparisons between groups were performed using one-way ANOVA with Tukey post-hoc for normally distributed data or Kruskal-Wallis with Dunn multiple comparison test for non-normally distributed data; Student's *t* and Mann-Whitney U Tests were calculated when appropriate. To verify the existence of a correlation between salivary flow rates or other parameters, Pearson's correlation test was performed. The chi-square test was used to analyze categorized variables. All statistical tests and P values were 2-tailed with results considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Subjects' characteristics

Age, gender, education, job status, smoking and alcohol consumption history, diastolic blood pressure and nephropathy did not differ significantly between groups. As expected, BMI, hypertension, and retinopathy were found to be significantly higher in diabetic groups (controlled and poorly controlled) compared to the control, whereas systolic blood pressure, number of medications and obesity were found to be significantly higher in poorly controlled T2DM as compared to other groups. There were significant differences in fasting plasma glucose and HbA1c among all three groups. The median time since DM2 diagnosis was 5.00 years in the controlled group and 7.00 in the poorly controlled group ($P < 0.001$) (Table 1).

Half of the controlled T2DM group reported that they had frequent thirst and difficulty in swallowing dry foods compared to the other groups ($P < 0.05$). Nearly half of the diabetic patients (controlled and poorly controlled) reported that they suffered from xerostomia compared to the control group ($P = 0.001$). No significant difference of other parameters was observed in all groups (Table 1).

Salivary flow rates

Both the UWS and ULS flow rates were significantly lower in the diabetic groups compared with the controls ($P = 0.002$ and $P = 0.027$, respectively). The SWS flow rate in the poorly controlled T2DM was the lowest among the groups ($P = 0.026$).

The percentage of individuals with an UWS flow rate of < 0.1 mL/min was higher in diabetic groups, indicating that both groups, independent of the glycemic control, presented hyposalivation ($P = 0.013$), whereas the percentage of subjects with SWS flow rate of < 0.7 mL/min in the poorly controlled T2DM group was the highest among all groups ($P = 0.030$). No

significant differences were found between groups regarding the percentage of individuals with an ULS flow rate of $<3.94 \mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$ and the concomitant salivary flow rates (Table 2).

The UWS and SWS flow rates in the control group ($r=0.664$, $P<0.001$), in the controlled T2DM group ($r=0.580$, $P<0.001$) and in the poorly controlled T2DM group ($r=0.741$, $P<0.001$) were positively correlated. However, no significant correlations were found between ULS flow rate and others salivary flow rates.

Regarding correlations between the studied salivary flow rates, a negative correlation between HbA1c and the SWS flow rate in the control group ($r=-0.366$, $P=0.024$) and a positive correlation between age and the SWS flow rate in the controlled T2DM group ($r=0.493$, $P=0.002$) were found. In the controlled T2DM, positive correlations between duration of diabetes and age ($r=0.381$, $P=0.022$) were noted. No significant correlations were found either between the salivary flow rates and number of medications among the groups examined or between the salivary flow rates and diabetes duration. Furthermore, no significant difference was observed in the comparison of salivary flow rates according to the presence of hypertension, obesity, nephropathy and retinopathy ($P>0.05$).

Concentration of plasma and salivary CHGA

The concentrations of plasma and salivary CHGA were significantly higher in the diabetic groups compared to the control ($P=0.019$ and $P<0.001$ and, respectively) (Table 2). On the other hand, no significant difference was found in output values of salivary CHGA between groups.

In the control group, the concentration of salivary CHGA was negatively correlated with SWS flow rate ($r=-0.415$, $P=0.010$) and positively correlated with the number of medications ($r=0.366$, $P=0.024$). However, similar correlations were not observed in T2DM patients.

After the comparison of the groups according to xerostomia, the following data were observed: a significantly lower UWS flow rate ($P=0.011$) and a higher frequency of age, number of medications and concentration of salivary CHGA ($P=0.011$, $P=0.003$ and $P<0.001$, respectively) were found in diabetic groups without xerostomia compared to the control ones. The diabetic groups with xerostomia compared to control revealed a higher quantity of medications ($P=0.020$) (Table 3).

Genotype frequencies for T-415C and Glu264Asp and their influence in the CHGA production and salivary gland flow rates

Distribution of CHGA genotypes and alleles did not significantly differ among controls and diabetic groups. It is also worth noting that there was no GG genotype in the control group for the Glu264Asp polymorphism (Table 4).

To verify the production of CHGA under subject genotype, median concentrations of plasma and salivary CHGA according to the T-415C and Glu264Asp polymorphisms are described in Table 5. No significant difference was found between groups at the comparison

of T-415C and Glu264Asp polymorphisms and concentration of plasma CHGA. Nevertheless, the analysis of polymorphism rs9658635 (T-415C) in the CHGA promoter region showed that both diabetic groups with the homozygous genotype CC had a significantly higher concentration of salivary CHGA than the control group ($P=0.008$). Similarly, when the influence of the C allele is compared between groups, a higher salivary CHGA concentration in both the diabetic groups was observed ($P=0.005$). In addition, for rs9658655 (Glu264Asp) CHGA polymorphism we found a significantly higher concentration of salivary CHGA in the controlled and poorly controlled T2DM groups with the CC genotype ($P=0.042$) compared to the control group. In the meantime, the presence of the C allele revealed a significant increase in salivary CHGA concentration in the diabetic groups compared to the control group ($P=0.001$).

Comparisons of CHGA polymorphisms with salivary flow rates were examined and the results are observed in Table 6. Significant differences were noted between the C allele of the CHGA T-415C polymorphism and lower UWS flow rates in diabetic groups compared to control ($P=0.006$). Additionally, for the C allele in exon 6 of the CHGA, lower values of UWS flow rates were also observed in diabetic groups ($P=0.002$). On the other hand, for the genotype TT (T-415C polymorphism), the UWS and SWS flow rates were significantly lower in the poorly controlled T2DM than the control group ($P=0.044$ and $P=0.006$, respectively). Furthermore, for the ULS flow rates, statistical analysis of genotype frequency showed no relationship between the polymorphisms (rs9658635 and rs9658655).

DISCUSSION

The present cross-sectional study revealed significantly lower salivary flow rates (UWS and ULS) in the T2DM groups, regardless of their glycemic control; however, SWS flow rates were significantly lower in the poorly controlled T2DM group. Likewise, comparing the percentage of hyposalivation between groups, a higher frequency of UWS hyposalivation was found in both diabetic groups (Table 2), while SWS hyposalivation was more frequent in the poorly controlled T2DM group (47.22%). The glycemic control status did not influence the results of unstimulated saliva in either group of diabetic patients, but it appears to influence the stimulated flow rate in poorly controlled T2DM patients. These results suggest a level of complication even greater in salivary glands, which cannot compensate for the failure that it is produced at resting salivary flow. This has important clinical consequences, since UWS deficiencies can be compensated by chewing, gustatory stimuli or medications. UWS and SWS hyposalivation combined often require symptomatic treatment with saliva substitutes, since the salivary glands do not respond favorably to stimuli.

The reduced salivary flow rate in diabetic patients found in this study is in accordance with previous findings [13,14,12,15-18]. Persistent hyperglycemia caused by dysregulation of

the diabetes may result in loss of body water, and diabetes-related structural changes in the salivary glands may contribute to a decline in unstimulated salivary secretion [26]. Poorly controlled T2DM appears to have lower stimulated parotid flow rates than those that are well-controlled [14]. Notwithstanding, there is no consensus in the literature on the association between DM and salivary gland dysfunction due to contradictory results [27,28,19,26]. The effects of T2DM on salivary glands' output have been previously studied, but few studies subdivide diabetic patients according to glycemic control status and none have evaluated the unstimulated upper labial salivary gland flow rate in diabetics. Methodological differences, including selection criteria of the samples, design of the study, type of medications, age [29], level of diabetic control, duration and types of diabetes are factors that may have contributed to the conflicting results found.

Regarding correlations between the studied salivary flow rates, a positive correlation of age with SWS flow rate in the controlled T2DM group was found, which could be explained by the fact that the controlled T2DM group contains patients that are older than other groups. Interestingly, a negative correlation between HbA1c and SWS flow rate was found only in the control group, which differs from a previous study that reported an association between lower UWS and SWS flow rates and elevated HbA1c levels in diabetic patients [30], probably due to the inclusion of patients with both types of diabetes.

Complaints of xerostomia were greater in both diabetic groups, closely resembling the results in the literature [11,15,16,30], and it is usually associated with salivary gland hypofunction [31,32]. Although subjects with xerostomia in both diabetic groups had lower salivary flow rates (UWS, SWS and ULS), there was no significant difference compared to the control subjects (Table 3). Likewise, no significant differences were found between groups regarding the levels of salivary CHGA and the presence of xerostomia. On the contrary, Shigeyama et al. [33] reported that individuals with dry mouth had increased salivary levels of CHGA compared with those without dry mouth. These data can be explained by the presence of only three individuals in our control group with xerostomia.

Malfunctioning of salivary glands resulting in insufficient salivary flow rates and xerostomia can have a negative impact on the quality of life of patients with diabetes and may increase susceptibility to dental caries, periodontal disease, oral infections through decreases in salivary clearance, reductions in buffering capacity as well as decreases in antimicrobial activity [34]. These salivary impairments reported in this study may be due to the increase of polyuria or diuresis, which causes a reduction in extracellular fluid and, as a consequence, affects the production of saliva [35]. Moreover, as a result of metabolic dysregulation, DM often causes microvascular alterations that are capable of compromising the ability of salivary glands to respond to neural or hormonal stimulation [14]. Hyposalivation may still be attributable to the structural changes caused by DM in the salivary glands, such as acinar atrophy and adipose infiltration [35].

Previous investigations have indicated that there may be an association between hypertension, or the intake of anti-hypertensive medications, and dry mouth. Reduced

salivary flow rates were found in hypertensive subjects [36,26] and in individuals taking anti-hypertensive medications, presumably attributable to the medications [37,38]. However, our findings are contradictory because no significant differences were observed in the comparison of salivary flow rates according to the presence of hypertension and other complications (such as obesity, nephropathy and retinopathy).

The results of this study indicate that the number of medications had no significant effect on salivary flow rates in patients with diabetes and control subjects because no significant correlations were found, even though previous findings suggest that intake of medications is associated with reduction in salivary flow rates [18]. Since we did not find any correlation in diabetic groups with parameters that can influence the salivary flow rates (such as hypertension and medication intake), our data allowed us to separate specific effects of diabetes on salivary secretion from non-specific effects that may lead to biased results.

In clinical medicine, CHGA is routinely used as a diagnostic marker of cancers and neurodegenerative diseases [2,1,5]. Sparse information exists regarding the role of CHGA in T2DM, but a previous study has shown an overexpression of CHGA in the saliva of T2DM patients and its potential as a non-invasive biomarker for this disease; however, this study evaluated a sample of 30 T2DM patients, not considering the status of glycemic control. [3]. The present study, doubling the sample size and considering glycemic control status, demonstrated that elevated levels of plasma and salivary CHGA were associated with T2DM patients, regardless of the glycemic control, which reinforces the findings from a previous study [3].

Furthermore, the salivary levels of CHGA in subjects studied correlated closely with the plasma levels, confirming that CHGA passes from the blood vessels into the glandular cells [39,40]. This observation suggests that both salivary and circulating CHGA can be used for clinical application as complementary markers. In addition, recent studies analyzed the hypothesis that CHGA detection at the salivary level may have higher analytical and diagnostic performance, since salivary sampling is non-invasive, stress-free, fast, easy to collect and, in contrast to the circulating form, CHGA in saliva is not bound to other proteins. Den et al. suggest that in physiological conditions circulating and salivary CHGA have different routes of secretion: indeed, salivary CHGA peaks upon awakening and then quickly decreases after 1 hour maintaining a low level throughout the day, whereas plasma CHGA did not shown any circadian rhythm [40].

To our knowledge, we are the first to report the association between CHGA genetic profile in T2DM patients and the concentration of CHGA and salivary dysfunctions. According to our findings, significant differences were observed in concentrations of salivary CHGA in T2DM patients for two gene regions: the promoter and the coding region (exon 6). The analysis of polymorphism rs9658635 (T-415C) in the CHGA promoter region showed a significant association between the genotype CC and higher concentration of salivary CHGA in both T2DM groups. Similarly, when the influence of the C allele is compared between

groups, a significant increase in the concentration of salivary CHGA in both the diabetic groups was observed.

In addition, for rs9658655 (Glu264Asp) CHGA polymorphism analyses, we found a significantly higher concentration of salivary CHGA in both T2DM groups with the CC genotype compared to the control group. Furthermore, for the C allele of the CHGA Glu264Asp polymorphism, significantly higher concentrations of salivary CHGA were found in the diabetic groups compared to the control group, suggesting that these polymorphisms may have direct consequences for the production/expression of salivary CHGA in diabetic patients. This might be explained by tissue-specific gene expression, indicating that the greater expression was local, and possibly this production can be related to the salivary stimulus. In a previous study it was verified that CHGA is produced in the serous and ductal cells of the human submandibular gland [4] and, moreover, this gland is responsible for 70% of all saliva secreted in the oral cavity. However, this insight into CHGA polymorphisms and their association with salivary gland function in T2DM patients needs to be explored in the future.

The influence of CHGA polymorphisms on the molecular mechanism that may affect the concentration of salivary and plasma CHGA has not been absolutely established. It is known that protein CHGA is the source of the dysglycemic peptide pancreastatin (PST) (human CHGA_{250 to 301}) [22], which antagonizes the effects of insulin on glucose and lipid metabolism coupled with its inhibitory effect on insulin secretion, and it is hypothesized that PST plays a crucial role in the development of insulin resistance. This hypothesis is supported by the observation that PST levels rise in T2DM [41,42]. Therefore, it is reasonable that the CHGA promoter variants (T-415C) and the Glu264Asp polymorphism could affect T2DM pathogenesis through the functional alteration of PST by regulating insulin secretion. Also, the importance of the PST polymorphism was supported by the observation that the Gly297Ser polymorphism influences glucose uptake [41]. Nonetheless, the exact role of PST in the pathogenesis of insulin-resistance and T2DM remains to be elucidated.

Rao et al. [43] described a significant association between decreased urinary albumin excretion and CC genotype in Glu264Asp when compared to the GG genotype in non-diabetic subjects. On the other side, albuminuria is a well-known predictor of poor renal outcomes in patients with type 2 diabetes [23]. Thus, this CHGA genetic variant may be associated with the pathogenesis of DM.

Moreover, the associations of T-415C and Glu264Asp polymorphisms with a reduced UWS flow rate in diabetic individuals were somewhat similar to the results found for the concentration of salivary CHGA. Significantly lower UWS flow rates were observed with the presence of the C allele in the T-415C polymorphism and in the exon 6 of the CHGA gene in the diabetic groups compared to the control. Additionally, significantly lower SWS flow rates in diabetic groups were observed with the presence of the C allele in the exon 6 compared to the control. On the other hand, a significant association in the poorly controlled T2DM group was observed for the T-415C TT homozygosis and reduced UWS and SWS flow rate,

suggesting that the presence of TT homozygosis has an important role in reducing salivary flow rates in the poorly controlled T2DM group. This observation led us to further examine that perhaps the TT homozygosis has a relationship with the glycemic control status, and this could explain why higher incidence and severity of oral complications were found in patients with poor DM control in comparison with control groups.

These results could be explained by the fact that CHGA is a valuable indicator of sympathoadrenal activity [21,22], and that salivary secretion control is regulated by the sympathetic and parasympathetic nervous system. It is known that DM is associated with chronic complications such as neuropathy, autonomic nervous system dysfunction, microvascular abnormalities [10] and endothelial dysfunction, which lead to deterioration of microcirculation, and this may play a role in reducing the salivary flow rate and different effects on protein components of the saliva [26,44]. Therefore, our results raise the possibility that CHGA genetic profiling of patients with T2DM might yield salivary gland impairments, resulting in reduced flow rates and increased concentration of salivary CHGA.

Limitations of the current study comprise the relatively modest number of subjects included to assess the genetic profile and the fact that the Brazilian population is characterized by a high genetic heterogeneity. Despite these limitations, the results are pioneering since the genotype frequencies found between alleles did not differ statistically, showing that the distribution between groups was homogeneous ($p > 0.05$).

The findings in the present study should be interpreted with caution, given certain limitations. First, it is a cross-sectional examination and therefore cannot establish causality. Furthermore, the sample size was limited slightly due to the stringent eligibility criteria, which were implemented to ensure that the number of potential confounders was minimized. This work encourages further studies to investigate whether these observations can establish a role for CHGA as a potential clinical biomarker for T2DM.

CONCLUSION

In summary, the results of this study support the proposal that T2DM causes abnormalities in the functioning of salivary glands. However, poorly controlled T2DM has the most influence on SWS flow rates. Our findings indicate an association between plasma and salivary CHGA levels and T2DM patients. Furthermore, the results suggest that an appropriate CHGA genetic background might be associated with lower salivary flow rates and higher salivary CHGA production. Since T2DM has a great influence on quality of life, it is worthwhile exploring further large-scale, longitudinal studies to elucidate the pathophysiologic role of CHGA as a biomarker for T2DM patients.

Acknowledgments. The present study would not have been possible without the participation of the patients and healthy volunteers. The authors would also like to thank Isabel Cristina Marques Fensterseifer, Larissa Bittencourt, Selma Soares Nascimento, Diego

Batista da Silva and Poliana Amanda Oliveira Silva for their excellent help with the experiments.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

Funding. This study was supported by grants from the Universidade de Brasília (DPP 10/2011) and Universidade Católica de Brasília (UCB).

Author contributions. E.M.K designed and performed experiments, wrote and edited the manuscript. I.A A. researched and collected data. D.C.G. contributed to the manuscript and collected data. O.N.S. designed experiments, analyzed the data and contributed to the manuscript. T.M.B.R. contributed to the discussion and reviewed the manuscript. D.P.F.R., O.L.F. and R.F.B.A. designed the study, researched data and contributed to the manuscript. I.C.R.S. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

1. Stridsberg M, Oberg K, Li Q, Engstrom U, Lundqvist G (1995) Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *J Endocrinol* 144 (1):49-59
2. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Bouillon R, Lamberts SW (1998) Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. *Eur J Clin Invest* 28 (6):431-440
3. Soell M, Feki A, Hannig M, Sano H, Pinget M, Selimovic D (2010) Chromogranin A detection in saliva of type 2 diabetes patients. *Bosn J Basic Medical Sci* 10 (1):2-8
4. Saruta J, Tsukinoki K, Sasaguri K, Ishii H, Yasuda M, Osamura YR, Watanabe Y, Sato S (2005) Expression and localization of chromogranin A gene and protein in human submandibular gland. *Cells Tissues Organs* 180 (4):237-244. doi:10.1159/000088939
5. O'Connor DT, Bernstein KN (1984) Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 311 (12):764-770. doi:10.1056/NEJM198409203111204
6. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD (1986) Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 324 (6096):476-478. doi:10.1038/324476a0
7. Gonzalez-Yanes C, Sanchez-Margalet V (2000) Pancreastatin modulates insulin signaling in rat adipocytes: mechanisms of cross-talk. *Diabetes* 49 (8):1288-1294
8. Tabish SA (2007) Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? *Int J Health Sci* 1 (2):V-VIII

9. Vesterinen M, Ruokonen H, Furuholm J, Honkanen E, Meurman JH (2011) Oral health in predialysis patients with emphasis on diabetic nephropathy. *Clin Oral Invest* 15 (1):99-104. doi:10.1007/s00784-009-0360-7
10. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR (2000) Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321 (7258):405-412
11. Moore PA (2002) The diabetes-oral health connection. *Compend Contin Educ Dent* 23 (12 Suppl):14-20
12. Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, Singh J (2004) Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Molecular Cell Biochem* 261 (1-2):137-142
13. Khovidhunkit SO, Suwantuntula T, Thaweboon S, Mitirattanakul S, Chomkhakhai U, Khovidhunkit W (2009) Xerostomia, hyposalivation, and oral microbiota in type 2 diabetic patients: a preliminary study. *J Med Assoc Thai* 92 (9):1220-1228
14. Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, Ship JA (2000) Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 89 (3):305-311
15. Bernardi MJ, Reis A, Loguercio AD, Kehrig R, Leite MF, Nicolau J (2007) Study of the buffering capacity, pH and salivary flow rate in type 2 well-controlled and poorly controlled diabetic patients. *Oral health Prev Dent* 5 (1):73-78
16. Ben-Aryeh H, Cohen M, Kanter Y, Szargel R, Laufer D (1988) Salivary composition in diabetic patients. *J Diabet Complications* 2 (2):96-99
17. Vasconcelos AC, Soares MS, Almeida PC, Soares TC (2010) Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. *J Oral Sci* 52 (2):293-298
18. Smidt D, Torpet LA, Nauntofte B, Heegaard KM, Pedersen AM (2010) Associations between labial and whole salivary flow rates, systemic diseases and medications in a sample of older people. *Community Dent Oral Epidemiol* 38 (5):422-435. doi:10.1111/j.1600-0528.2010.00554.x
19. Meurman JH, Collin HL, Niskanen L, Toyry J, Alakuijala P, Keinänen S, Uusitupa M (1998) Saliva in non-insulin-dependent diabetic patients and control subjects: The role of the autonomic nervous system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 86 (1):69-76
20. Newrick PG, Bowman C, Green D, O'Brien IA, Porter SR, Scully C, Corral RJ (1991) Parotid salivary secretion in diabetic autonomic neuropathy. *J Diabet Complications* 5 (1):35-37
21. Moulant AJ, Bevan S, White JH, Hendy GN (1994) Human chromogranin A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *J Biol Chem* 269 (9):6918-6926
22. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348 (12):1134-1149. doi:10.1056/NEJMra021405
23. American Diabetes A (2014) Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* 37 Suppl 1:S14-80. doi:10.2337/dc14-S014
24. Falcao DP, Leal SC, Vieira CN, Wolff A, Almeida TF, Nunes Fde P, de Amorim RF, Bezerra AC (2014) Sialometry of upper labial minor glands: a clinical approach by the use of weighing method Schirmer's test strips paper. *ScientificWorldJournal* 2014:268634. doi:10.1155/2014/268634
25. Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, Huang M, Obara T, Narita S, Horikawa Y, Tsuruta H, Saito M, Satoh S, Ogawa O, Habuchi T (2010) Clinical significance of polymorphism and expression of chromogranin a and endothelin-1 in prostate cancer. *J Urol* 184 (3):1182-1188. doi:10.1016/j.juro.2010.04.063
26. Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA (2000) Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol* 28 (5):373-381
27. Streckfus CF, Marcus S, Welsh S, Brown RS, Cherry-Peppers G, Brown RH (1994) Parotid function and composition of parotid saliva among elderly edentulous African-American diabetics. *J Oral Pathol Med* 23 (6):277-279
28. Cristina de Lima D, Nakata GC, Balducci I, Almeida JD (2008) Oral manifestations of diabetes mellitus in complete denture wearers. *J Prosthet Dent* 99 (1):60-65. doi:10.1016/S0022-3913(08)60010-4

29. Moritsuka M, Kitasako Y, Burrow MF, Ikeda M, Tagami J, Nomura S (2006) Quantitative assessment for stimulated saliva flow rate and buffering capacity in relation to different ages. *J Dent* 34 (9):716-720. doi:10.1016/j.jdent.2006.01.004
30. Sreebny LM, Yu A, Green A, Valdini A (1992) Xerostomia in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15 (7):900-904
31. Ben-Aryeh H, Serouya R, Kanter Y, Szargel R, Laufer D (1993) Oral health and salivary composition in diabetic patients. *J Diabet Complications* 7 (1):57-62
32. Beeley JA, Khoo KS, Lamey PJ (1991) Two-dimensional electrophoresis of human parotid salivary proteins from normal and connective tissue disorder subjects using immobilised pH gradients. *Electrophoresis* 12 (7-8):493-499. doi:10.1002/elps.1150120707
33. Shigeyama C, Ansai T, Awano S, Soh I, Yoshida A, Hamasaki T, Kakinoki Y, Tominaga K, Takahashi T, Takehara T (2008) Salivary levels of cortisol and chromogranin A in patients with dry mouth compared with age-matched controls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106 (6):833-839. doi:10.1016/j.tripleo.2008.07.005
34. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK (2005) Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 33 (3):223-233. doi:10.1016/j.jdent.2004.10.009
35. Carda C, Carranza M, Arriaga A, Diaz A, Peydro A, Gomez de Ferraris ME (2005) Structural differences between alcoholic and diabetic parotid sialosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 10 (4):309-314
36. van Hooff M, van Baak MA, Schols M, Rahn KH (1984) Studies of salivary flow in borderline hypertension: effects of drugs acting on structures innervated by the autonomic nervous system. *Clin Sci* 66 (5):599-604
37. Persson RE, Izutsu KT, Treulove EL, Persson R (1991) Differences in salivary flow rates in elderly subjects using xerostomatic medications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 72 (1):42-46
38. Nederfors T, Dahlof C (1992) Effects of the beta-adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human whole saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 37 (7):579-584
39. Dag E, Aydin S, Ozkan Y, Erman F, Dagli AF, Gurger M (2010) Alteration in chromogranin A, obestatin and total ghrelin levels of saliva and serum in epilepsy cases. *Peptides* 31 (5):932-937. doi:10.1016/j.peptides.2010.02.009
40. Den R, Toda M, Nagasawa S, Kitamura K, Morimoto K (2007) Circadian rhythm of human salivary chromogranin A. *Biomed Res* 28 (1):57-60
41. O'Connor DT, Cadman PE, Smiley C, Salem RM, Rao F, Smith J, Funk SD, Mahata SK, Mahata M, Wen G, Taupenot L, Gonzalez-Yanes C, Harper KL, Henry RR, Sanchez-Margalet V (2005) Pancreastatin: multiple actions on human intermediary metabolism in vivo, variation in disease, and naturally occurring functional genetic polymorphism. *J Clinical Endocrinol Metab* 90 (9):5414-5425. doi:10.1210/jc.2005-0408
42. Funakoshi A, Tateishi K, Shinozaki H, Matsumoto M, Wakasugi H (1990) Elevated plasma levels of pancreastatin (PST) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Regul Pept* 30 (2):159-164
43. Rao F, Wessel J, Wen G, Zhang L, Rana BK, Kennedy BP, Greenwood TA, Salem RM, Chen Y, Khandrika S, Hamilton BA, Smith DW, Holstein-Rathlou NH, Ziegler MG, Schork NJ, O'Connor DT (2007) Renal albumin excretion: twin studies identify influences of heredity, environment, and adrenergic pathway polymorphism. *Hypertension* 49 (5):1015-1031. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.081679
44. Conner S, Iranpour B, Mills J (1970) Alteration in parotid salivary flow in diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 30 (1):55-59

Table 1 - Subjects characteristics according to study group.

Parameters	Control (n=38)	Controlled T2DM (n=36)	poorly controlled T2DM (n=36)	P
Age, years (Median) (25 th , 75 th percentile)	51.00 (50.00, 56.75)	57.50 (51.75, 62.00)	56.50 (48.00, 64.00)	0.050 [†]
Male:Female (n) (%)	18:20 (47.37: 52.6)	12:24 (33.33: 66.67)	13:23 (36.11: 63.89)	0.421 [§]
Education (n) (%)				
Less than high school	20 (52.63)	26 (72.22)	21 (58.33)	0.209 [§]
High school	14 (36.84)	6 (16.67)	14 (38.89)	0.077 [§]
More than high school	4 (10.53)	4 (11.11)	1 (2.78)	0.352 [§]
Job status (n) (%)				
Not employed	15 (39.47)	24 (66.67)	17 (47.22)	0.056 [§]
Employed	23 (60.53)	12 (33.33)	19 (52.78)	
Smoking (current/never/former) (n) (%)	8/22/8 (21.05/ 57.89/ 21.05)	1/24/11 (2.78/ 66.67/ 30.56)	4/24/8 (11.11/ 66.67/ 22.22)	0.175 [§]
Alcohol consumption (current/never/former) (n) (%)	9/25/4 (23.68/ 65.79/ 10.53)	8/25/3 (22.22/69.44/ 8.33)	5/26/5 (13.89/ 72.22/13.89)	0.800 [§]
BMI, Kg/m ² (Mean ± Standard deviation)	25.41 ± 4.05 ^a	28.04 ± 4.73 ^b	29.53 ± 5.05 ^b	0.001^{#*}
Systolic BP, mmHg (Median) (25 th , 75 th percentile)	130.00 ^a (120.00, 137.50)	130.00 ^{a,b} (120.00, 142.50)	140.00 ^b (130.00, 140.00)	0.013^{†*}
Diastolic BP, mmHg (Median) (25 th , 75 th percentile)	80.00 (80, 90)	80.00 (80, 90)	80.00 (80, 90)	0.312 [†]
Diabetes duration, years (Median) (25 th , 75 th percentile)	NA	5.00 ^a (1.75, 8.50)	7.50 ^b (5.00, 15.25)	< 0.001^{†*}
Fasting plasma glucose, mg/dL (Mean ± Standard deviation)	98.58 ± 9.53 ^a	127.19 ± 26.79 ^b	214.53 ± 72.06 ^c	< 0.001^{#*}
HbA1c, % (Mean ± Standard deviation)	5.58 ± 0.22 ^a	6.29 ± 0.38 ^b	9.08 ± 1.53 ^c	< 0.001^{#*}
Number of medications (Median) (25 th , 75 th percentile)	0.00 ^a (0, 0)	4.00 ^b (3, 5)	3.00 ^b (2, 4)	<0.001^{†*}
Hypertension (n)(%)	5 (13.16) ^a	28 (77.78) ^b	20 (55.56) ^b	< 0.001^{§*}
Obesity (n)(%)	6 (15.79) ^a	9 (25.00) ^{a,b}	15 (41.67) ^b	0.041^{§*}
Nephropathy (n)(%)	2 (5.26)	1 (2.78)	3 (8.33)	0.582 [§]
Retinopathy (n)(%)	1 (2.63) ^a	8 (22.22) ^b	10 (27.78) ^b	0.011^{§*}

Number of teeth (Median) (25 th , 75 th percentile)	22.50 (13.00, 25.75)	13.50 (9.00, 23.00)	16.50 (9.75, 25.25)	0.102 [†]
Total edentulous (n)(%)	1 (2.63)	4 (11.11)	5 (13.89)	0.212 [§]
Frequent thirst (n)(%)	7 (18.42) ^a	18 (50.00) ^b	12 (33.33) ^{a,b}	0.016 ^{§*}
Difficulty in swallowing dry foods (n)(%)	7 (18.42) ^a	19 (52.78) ^b	14 (38.89) ^{a,b}	0.008 ^{§*}
Speech impairment (n)(%)	4 (10.53)	10 (27.78)	9 (25.00)	0.145 [§]
Need to drink while eating (n)(%)	9 (23.68)	11 (30.56)	13 (36.11)	0.505 [§]
Wake up thirsty at night (n)(%)	11 (28.95)	20 (55.56)	17 (47.22)	0.061 [§]
Altered taste (n)(%)	7 (18.42)	8 (22.22)	11 (30.56)	0.457 [§]
Saliva substitute or medication (n)(%)	0	0	0	NA
Salivary gland alterations (n)(%)	2 (5.26)	4 (11.11)	3 (8.33)	0.656 [§]
Xerostomia (n)(%)	3 (7.89) ^a	16 (44.44) ^b	15 (41.67) ^b	0.001 ^{§*}
Burning tongue sensation (n)(%)	4 (10.53)	4 (11.11)	1 (2.78)	0.352 [§]
Burning cheeks sensation (n)(%)	0 (0.00)	1 (2.78)	2 (5.56)	0.341 [§]
Burning lips sensation (n)(%)	3 (7.89)	4 (11.11)	6 (16.67)	0.499 [§]

† *Kruskal-Wallis with Dunn multiple comparison test*, § *Chi-squared test*, # *One-way ANOVA with Tukey post hoc*, ¶ *Mann-Whitney U Test*, NA = not applicable, * *P<0.05*
Different letters indicate significant statistical differences amongst groups

Table 2 – Comparison of salivary flow rates and levels of CHGA between groups.

Parameters	Control (n=38)	Controlled T2DM (n=36)	Poorly controlled T2DM (n=36)	P
UWS flow rate, mL/min (Median) (25 th , 75 th percentile)	0.30 ^a (0.16, 0.46)	0.16 ^b (0.08, 0.28)	0.13 ^b (0.06, 0.27)	0.002 ^{††}
SWS flow rate, mL/min (Median) (25 th , 75 th percentile)	1.07 ^a (0.84, 1.46)	0.88 ^{a,b} (0.52, 1.11)	0.72 ^b (0.52, 1.22)	0.026 ^{††}
ULS flow rate, µL/cm ² /min (Median) (25 th , 75 th percentile)	4.37 ^a (3.01, 7.09)	3.80 ^b (2.27, 4.52)	3.52 ^b (1.97, 5.35)	0.027 ^{††}
Prevalence of hyposalivation Percentage with UWS flow rate <0.1 mL/min (n)	5.26% (2) ^a	27.78% (10) ^b	30.56% (11) ^b	0.013 ^{§*}
Percentage with SWS flow rate <0.7 mL/min (n)	18.42% (7) ^a	36.11% (13) ^{a,b}	47.22% (17) ^b	0.030 ^{§*}
Percentage with ULS flow rate <3.94 µL/cm ² /min (n)	42.11% (16)	55.56% (20)	52.78% (19)	0.472 [§]
Percentage with concomitant UWS and SWS hyposalivation (n)	5.26% (2)	16.67% (6)	19.44% (7)	0.167 [§]
Percentage with concomitant UWS, SWS and ULS hyposalivation (n)	5.26% (2)	8.33% (3)	11.11% (4)	0.656 [§]
Concentration				
Salivary CHGA (pmol/mL) (Median) (25 th , 75 th percentile)	1.53 ^a (1.37, 1.82)	1.84 ^b (1.73, 2.10)	1.99 ^b (1.67, 2.16)	<0.001 ^{†*}
Plasma CHGA (pmol/mL) (Median) (25 th , 75 th percentile)	1.34 ^a (1.18, 1.52)	1.50 ^b (1.41, 1.97)	1.44 ^b (1.22, 1.98)	0.019 ^{†*}
Output				
Salivary CHGA (pmol/min) (Median) (25 th , 75 th percentile)	1.60 (1.37, 2.08)	1.62 (1.01, 2.22)	1.28 (0.79, 2.13)	0.271 [†]

† Kruskal-Wallis with Dunn multiple comparison test, § Chi-squared test, * P<0.05

Different letters indicate significant statistical differences amongst groups

Table 3 – Comparison of salivary flow rates, age, number of medication and concentration of salivary CHGA (pmol/mL) according the presence of xerostomia.

Parameters	Without xerostomia			P †	With xerostomia			P †
	Control Median (25 th , 75 th percentile)	Controlled T2DM Median (25 th , 75 th percentile)	Poorly controlled T2DM Median (25 th , 75 th percentile)		Control Median (25 th , 75 th percentile)	Controlled T2DM Median (25 th , 75 th percentile)	Poorly controlled T2DM Median (25 th , 75 th percentile)	
UWS flow rate, mL/min	0.30 ^a (0.16, 0.46)	0.17 ^b (0.11, 0.28)	0.10 ^b (0.06, 0.30)	0.011*	0.38 (0.18, 0.74)	0.13 (0.07, 0.29)	0.18 (0.10, 0.26)	0.281
SWS flow rate, mL/min	1.06 (0.82, 1.48)	0.98 (0.74, 1.24)	0.70 (0.50, 1.20)	0.158	1.08 (0.76, 3.62)	0.61 (0.44, 1.08)	0.74 (0.52, 1.34)	0.428
ULS flow rate, μ L/cm ² /min	4.33 (2.73, 7.23)	4.08 (2.30, 4.50)	4.30 (3.10, 5.10)	0.370	5.20 (4.33, 7.97)	3.00 (2.15, 4.60)	2.67 (1.70, 6.73)	0.243
Age, years	51 ^a (49, 55)	59 ^b (51, 63)	57 ^b (48, 64)	0.011*	57 (50, 64)	55 (52, 60)	52 (47, 63)	0.954
Number of medications	0.00 ^a (0.00, 0.00)	4.00 ^b (3.00, 5.50)	3.00 ^b (1.00, 5.00)	0.003*	2.00 ^a (0.00, 2.00)	3.00 ^b (2.00, 5.00)	3.00 ^b (2.00, 4.00)	0.020*
Concentration of salivary CHGA, pmol/mL	1.52 ^a (1.36, 1.82)	1.78 ^b (1.70, 1.94)	2.07 ^b (1.90, 2.26)	<0.001*	1.55 (1.10, 2.44)	1.93 (1.80, 2.30)	1.81 (1.24, 2.01)	0.130

† Kruskal-Wallis with Dunn multiple comparison test, * P<0.05

Different letters indicate significant statistically differences amongst groups

Table 4 – Genotypic and allele distributions for CHGA polymorphisms (T-415C and Glu264Asp) between groups.

		Control (n)(%)	Controlled T2DM (n)(%)	Poorly controlled T2DM (n)(%)	P §
T-415C	Genotype				
	CC	13 (34.21)	11 (30.56)	13 (36.11)	0.951
	CT	19 (50.00)	17 (47.22)	17 (47.22)	
	TT	6 (15.79)	8 (22.22)	6 (16.67)	
	Allele				0.264
	C	45 (59.21)	39 (54.17)	43 (46.74)	
T	31 (40.79)	33 (45.83)	49 (53.21)		
	Total	76 (100.00)	72 (100.00)	72 (100.00)	
Glu264Asp	Genotype				
	CC	17 (44.74)	13 (36.11)	17 (47.22)	0.536
	GC	21 (55.26)	21 (58.33)	17 (47.22)	
	GG	-	2 (5.56)	2 (5.56)	
	Allele				0.618
	C	55 (72.37)	47 (65.28)	51 (70.83)	
G	21 (27.63)	25 (34.72)	21 (29.17)		
	Total	76 (100.00)	72 (100.00)	72 (100.00)	

§ *Chi-squared test*

Table 5 – Comparison between CHGA polymorphisms and the concentration of plasma and salivary CHGA (pmol/mL).

Genotype Polymorphism/ Allele	CHGA plasma concentration (pmol/mL)			P	CHGA salivary concentration (pmol/mL)			P
	Control (Median) (25 th , 75 th percentile)	Controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)	Poorly controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)		Control (Median) (25 th , 75 th percentile)	Controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)	Poorly controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)	
T-415C								
CC	1.38 (1.11, 1.89)	1.59 (1.24, 1.97)	1.20 (1.00, 1.93)	0.613 [†]	1.36 ^a (1.30, 1.52)	1.80 ^b (1.76, 1.88)	1.86 ^b (1.41, 2.01)	0.008^{†*}
CT	1.29 (1.22, 1.68)	1.62 (1.20, 2.12)	1.51 (1.22, 2.00)	0.539 [†]	1.53 (1.42, 1.97)	1.83 (1.72, 1.99)	1.93 (1.48, 2.09)	0.204 [†]
TT	1.13 (1.07, 1.19)	1.63 (1.34, 1.86)	1.53 (1.00, 1.76)	0.548 [†]	1.68 (1.55, 2.03)	2.38 (1.73, 2.73)	2.22 (2.18, 2.56)	0.083 [†]
C	1.35 (1.20, 1.68)	1.59 (1.24, 1.98)	1.44 (1.00, 1.97)	0.445 [†]	1.48 ^a (1.34, 1.82)	1.81 ^b (1.73, 1.95)	1.89 ^b (1.42, 2.07)	0.005^{†*}
Glu264Asp								
CC	1.32 (1.11, 1.68)	1.73 (1.24, 1.97)	1.46 (1.00, 2.00)	0.373 [†]	1.46 ^a (1.36, 1.79)	1.81 ^b (1.76, 1.95)	1.88 ^b (1.41, 2.12)	0.042^{†*}
GC	1.28 (1.16, 1.58)	1.46 (1.23, 1.85)	1.31 (1.00, 1.96)	0.685 [†]	1.55 ^a (1.40, 1.82)	1.84 ^b (1.74, 2.10)	2.07 ^b (1.98, 2.18)	0.006^{†*}
GG	-	2.02 (1.79, 2.24)	1.26 (1.00, 1.52)	0.333 [¶]	-	2.32 (1.72, 2.93)	1.77 (1.75, 1.78)	0.999 [¶]
C	1.29 (1.15, 1.68)	1.49 (1.24, 1.92)	1.46 (1.00, 1.97)	0.412 [†]	1.53 ^a (1.36, 1.82)	1.84 ^b (1.74, 2.10)	2.01 ^b (1.48, 2.17)	0.001^{†*}

† Kruskal-Wallis with Dunn multiple comparison test, ¶ Mann-Whitney U Test, * P<0.05

Different letters indicate significant statistically differences amongst groups

Table 6 – Comparison between CHGA polymorphisms and salivary flow rates (UWS, SWS and ULS)

Genotype Polymorphism/ Allele	UWS flow rate (mL/min)			P	SWS flow rate (mL/min)			P	ULS flow rate ($\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{min}$)			P
	Control (Median) (25 th , 75 th percentile)	Controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)	Poorly controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)		Control (Median) (25 th , 75 th percentile)	Controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)	Poorly controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)		Control (Median) (25 th , 75 th percentile)	Controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)	Poorly controlled T2DM (Median) (25 th , 75 th percentile)	
T-415C												
CC	0.30 (0.16, 0.54)	0.22 (0.12, 0.36)	0.24 (0.10, 0.30)	0.208 [†]	1.06 (1.02, 1.52)	1.08 (0.96, 1.30)	1.02 (0.66, 1.12)	0.334 [†]	4.07 (2.33, 6.33)	2.97 (1.87, 4.33)	3.10 (1.77, 5.10)	0.537 [†]
CT	0.30 ^a (0.16, 0.46)	0.12 ^b (0.08, 0.18)	0.12 ^b (0.08, 0.34)	0.019 ^{†*}	1.08 (0.68, 1.30)	0.74 (0.44, 1.02)	0.60 (0.42, 1.40)	0.252 [†]	4.40 (2.73, 9.57)	3.30 (2.27, 4.67)	4.00 (2.00, 5.00)	0.212 [†]
TT	0.28 ^a (0.12, 0.40)	0.22 ^a (0.11, 0.41)	0.05 ^b (0.02, 0.10)	0.044 ^{†*}	0.95 ^a (0.76, 1.20)	0.75 ^{a,b} (0.61, 0.90)	0.56 ^b (0.30, 0.70)	0.006 ^{†*}	5.13 (3.03, 6.00)	4.17 (3.07, 4.90)	4.03 (3.07, 7.27)	0.763 [†]
C	0.30 ^a (0.16, 0.49)	0.15 ^b (0.08, 0.25)	0.18 ^b (0.10, 0.30)	0.006 ^{†*}	1.07 (0.93, 1.50)	0.99 (0.49, 1.24)	0.85 (0.52, 1.34)	0.142 [†]	4.37 (2.72, 7.67)	3.13 (2.17, 4.50)	3.52 (1.87, 5.10)	0.130 [†]
Glu264Asp												
CC	0.36 (0.18, 0.52)	0.22 (0.12, 0.36)	0.24 (0.08, 0.30)	0.129 [†]	1.06 (1.00, 1.48)	1.02 (0.74, 1.20)	0.84 (0.42, 1.26)	0.162 [†]	5.00 (2.70, 8.67)	4.27 (2.33, 5.33)	3.53 (2.67, 6.73)	0.595 [†]
GC	0.24 ^a (0.14, 0.42)	0.12 ^b (0.08, 0.22)	0.10 ^b (0.06, 0.24)	0.012 ^{†*}	1.08 (0.70, 1.30)	0.74 (0.48, 1.08)	0.63 (0.52, 1.08)	0.114 [†]	4.33 (3.03, 6.33)	2.97 (2.27, 4.33)	3.50 (1.87, 4.87)	0.110 [†]
GG	-	0.20 (0.18, 0.22)	0.17 (0.00, 0.34)	0.999 [¶]	-	1.01 (1.00, 1.02)	1.23 (0.74, 1.72)	0.999 [¶]	-	3.10 (2.13, 4.07)	3.88 (2.77, 5.00)	0.999 [¶]
C	0.30 ^a (0.16, 0.46)	0.15 ^b (0.08, 0.28)	0.13 ^b (0.06, 0.26)	0.002 ^{†*}	1.07 ^a (0.82, 1.48)	0.78 ^b (0.50, 1.20)	0.68 ^b (0.50, 1.20)	0.021 ^{†*}	4.37 (3.00, 7.23)	3.62 (2.27, 4.67)	3.52 (1.87, 6.10)	0.120 [†]


† Kruskal-Wallis with Dunn multiple comparison test, ¶ Mann-Whitney U Test, * P<0.05.

Different letters indicate significant statistical differences amongst groups

Manuscrito 3: Patients' perceptions towards diabetes mellitus and oral health: a cross-sectional study

Enviado e revisado na revista Periodontia

Extrato Capes: B5 (Medicina I)

		Sociedade Brasileira de Periodontologia Formulário Revisão – Parte 1 (Comentário para o Autor)	
Protocolo número: 210915-2		Data:	
Título:	A cross-sectional study on patient's perception about diabetes mellitus and oral health: an alert for health professionals.		

Patients' perceptions towards diabetes mellitus and oral health: a cross-sectional study

Percepções de pacientes sobre a relação entre diabetes mellitus e saúde oral: um estudo transversal

Authors: Evelyn Mikaela Kogawa¹, Poliana Amanda Oliveira Silva², Daniela Corrêa Grisi³, Taia Maria Berto Rezende⁴, Daniela Leite Bernardi⁵, Denise Pinheiro Falcão⁶, Rivadávio Fernandes Batista de Amorim⁷

¹Assistant Professor of Dental Prosthesis, Department of Prosthesis, School of Dentistry, Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasília, Brazil.

²Graduate Student, School of Dentistry, Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasília, Brazil.

³Assistant Professor of Periodontics, Department of Periodontics, School of Dentistry, Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasília, Brazil.

⁴Assistant Professor of Endodontics, Department of Endodontics, School of Dentistry, Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasília, Brazil.

⁵Pharmacist, School of Pharmacy, University of São Paulo (USP-SP), São Paulo-SP, Brazil.

⁶Visting Professor, Post-Graduation Program of Medical Sciences, University of Brasília (UnB-DF), Brasília, Brazil.

⁷Postdoctoral Research Fellow, Laboratory of Neuromodulation & Center for Clinical Research Learning, Harvard Medical School (HMS), Charlestown-Massachusetts, USA.

Correspondence: Rivadávio Fernandes Batista de Amorim

Laboratory of Neuromodulation & Center for Clinical Research Learning,
Harvard Medical School (HMS)

79/96, 13th Street, Charlestown-MA 02129, USA

Telephone: +1 (617) 952.6153

e-mail: ramorim@neuromodulationlab.org

Abstract

Purpose: To evaluate the knowledge of diabetic patients towards the connection between diabetes mellitus (DM) and oral diseases. Oral status was also assessed in order to evaluate the correlation among patients' perception and their oral health. **Material and Methods:** A sample of 132 diabetic subjects answered a questionnaire containing 12 questions addressing their knowledge, attitudes and practices related to oral health. Oral examination assessed the presence of cavity carious lesions, residual roots, dental biofilm, calculus, gingivitis, tooth mobility and gingival recession. **Results:** Fifty-four percent of the sample had never been instructed by their health professionals that DM could cause oral diseases. However, 66% presumed being more vulnerable to develop oral illnesses and 57.5% answered that they assumed having no oral disturbances at that moment. In contrast, intraoral clinical examination showed that 99% presented at least one oral injury such as caries lesions, plaque/calculus, gingival inflammation, tooth mobility, residual root and xerostomia. **Conclusions:** Health care professionals usually neglect oral status in diabetic patients. Above all, there is a huge

gap between patients' perceptions towards oral health and their real oral status. This study highlights the need of developing new models of prevention that properly address the important clinical relation between oral diseases and DM.

Keywords: Diabetes mellitus, oral health, oral diseases, diabetes-related complications.

Introduction

The World Health Organization (WHO) and the International Diabetes Federation (IDF) consider Diabetes Mellitus (DM) as a global epidemic disease. Worldwide, it is estimated that 382 million people have diabetes and the incidence tendency indicates that this number will reach 600 million by 2035 (IDF, 2012). Moreover, a considerable number of patients with type 2 diabetes remains undiagnosed for a long period, being unaware of the long-term co-morbidities related with the disease. Due to its chronic nature, several complications need specialized care. Hence, DM represents a massive concern of public health in many countries (IDF, 2012).

DM is a heterogeneous group of metabolic disorders with multiple etiologies. Not only total or relative insulin deficiency are observed but also insulin resistance on target tissues. Dysregulated immune system, followed by abnormalities in the metabolism of glucose, carbohydrates, lipids and proteins, usually associated with chronic hyperglycemia, play a key role on the pathogenesis of diabetes. In DM progression, the risk of systemic and oral complications increases and is even higher in subjects with uncontrolled disease (Segura-Egea et al., 2012). Most common systemic manifestations include macrovascular disorders (atherosclerosis, peripheral vascular disease and cerebrovascular disease) and microvascular conditions (retinopathy, neuropathy, and nephropathy) (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). In addition, people with poorly controlled DM may also have impaired wound healing and increased susceptibility to acute infections (Skamagas et al., 2008; Segura-Egea et al., 2012).

Some connections between DM and oral conditions are already known. In such scenario, periodontal disease (PD) is the most common relation associated to diabetes. Damage of periodontal tissues such as injury of connective tissue attachment and alveolar bone are the main features. (Mellado-Valero et al., 2007; Lamster et al., 2008). Severe periodontitis affects 5 to 15% of worldwide population and is one major cause of tooth loss (Burt, 2005). It has been shown that periodontal disease increases the levels of some serum markers, such as cytokines like tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-6, IL-1 β , prostaglandin-E2 and C-reactive protein (Nesse et al., 2008). These biomarkers enhance the general inflammatory burden in the body and impair the glycemic control (Ebrahimi et al., 2009). In addition, a long period of poorly controlled diabetes can aggravate the periodontal tissue destruction resulting in a bidirectional relationship between both diseases (Kaur et al., 2009; Corbella et al., 2013). PD is the sixth most frequent complication and its prevalence is around 83% in diabetic patients, while only 21.6% of subjects without diabetes have some type of PD (Mellado-Valero et al., 2007; Skamagas et al., 2008). The World Dental Federation and IDF recommend the prevention of oral diseases and the promotion of oral health as major rules in the DM management (Al-Habashneh et al., 2010).

Studies have also reported DM as a cause of hyposalivation (reduced salivary flow) and xerostomia (sensation of dry mouth) (Mata et al., 2004; Khovidhunkit et al., 2009). Hyposalivation increases the risk of oral infections, such as dental caries, oral candidiasis, PD and has a negative impact on the life quality (Mandel, 1987; Khovidhunkit et al., 2009). Additionally, oral lichen planus, dysgeusia, speech difficulties, dysphagia, and inadequate digestion are common findings in subjects with hyposalivation. This condition has been found during DM first stages (de Almeida et al., 2008; Lamster et al., 2008).

Although National Standards for Diabetes Self-Management Education Guidelines embrace prevention in order to avoid diabetes complications, it had not included dental experts amongst the task force members (Haas et al., 2013). International Diabetes Federation provides recommendations for oral health in diabetic patients; however, the guideline outlines that further research and clinical evidence are required before setting surveillance programs related to oral health in patients with diabetes (IDF, 2012). Above all, there is a lack of data regarding the knowledge and attitudes of diabetic patients towards oral health care and awareness about their higher susceptibility to systemic and oral complications (Moore et al., 2000; Allen et al., 2008; Eldarrat, 2011). Therefore, this study was designed to evaluate whether diabetic subjects are instructed by physicians and health care professionals about the bidirectional relationship between DM and oral diseases, as well as to verify the patients' self-perception of oral health.

Methods

Study design

A cross-sectional study was conducted during a public campaign about DM, which was held at the major bus terminal of Brasília, Distrito Federal, Brazil. The goal of the campaign was to instruct people about diabetes and to perform a screening test (Accu Chek Active - Roche, Mannheim, Germany) to verify the levels of fasting capillary glucose.

Individuals who fulfilled the inclusion criteria mentioned below (subsection "Sample") were invited to participate. The study was reviewed and approved by the IRB (IRB from the Catholic University of Brasilia Approval number: Protocol #288/2010) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. Written informed consent was obtained from all participants. All diabetic patients that presented fasting glucose levels >126 mg/dL (> 6.99 mmol/L) were referred to public health centers, and those who agreed to participate answered a self-report questionnaire. Afterwards, they underwent oral examination by two calibrated dentists.

Eligibility criteria

The patient inclusion criteria were: 1) ≥ 18 years old; 2) levels of fasting glucose > 126 mg/dL (> 6.99 mmol/L) at least in two occasions in order to guarantee the single measurement was not only a transient hyperglycemic peak; 3) individuals who have been previously diagnosed with DM by their physician. Individuals who were unable to respond to the questionnaire due to physical or cognitive deficiency were excluded.

Questionnaire administration

A self-report questionnaire was developed based on previously published studies (de Almeida et al., 2008; Allen et al., 2008). The questionnaire was composed of three sections. First, demographic data was collected (age, gender, occupation and type of diabetes). The second section included questions related to the patient's awareness about the relationship between oral health and DM, attitudes towards oral problems, relationship between smoking and DM and self-awareness of oral health. Finally, the last section was related to oral hygiene. A pilot study was previously conducted to verify the comprehensiveness of the questions and the feasibility of the study. For this purpose, a preliminary version of the questionnaire was applied on 30 diabetic volunteers. All necessary procedures were performed to ensure participants' privacy. The completed questionnaires were placed into sealed envelopes and subjects were identified by unique codes.

Clinical examination

The oral examination was performed under ambient lighting, using disposable spatulas. The presence of cavity carious lesions, residual roots, dental biofilm, calculus, gingival inflammation, tooth mobility and recession were determined by visual inspection. Clinical instruments were not used and neither X-rays were taken, since the purpose of the study was to perform an initial screening of the oral status. Patients were also asked about dry mouth sensation. Subsequently, patients received information regarding the relationship between DM and oral diseases. Whenever oral diseases were detected, participants were referred to a dental treatment at Catholic University of Brasília.

Statistical analysis

Descriptive analysis was performed with Statistical Package for Social Sciences (SPSS® version 20.0 for Windows®, SPSS Inc. /IBM Group, Chicago, USA).

Results

A total of 1414 subjects enrolled for the capillary glucose test. The results of 228 individuals (16.1%) were > 126 mg/dL (> 6.99 mmol/L). Finally, 132 subjects (9.3%) accepted to answer the questionnaire and go through intraoral examination (Table 1).

When asked about the relationship between oral complications and DM, 54% (n=71) reported that physicians neither provided information about the impact of diabetes on oral health nor that DM predisposes oral diseases. Nevertheless, 66% (n=87) assumed that diabetic subjects have higher chances for developing oral diseases. In addition, 69.7% (n=92) stated that their oral health would be better if they did not have DM. The results pointed out that 54% (n=71) were not satisfied with their oral health. Twenty nine point five percent (n=39) considered that they should search a physician and 44% (n=58) a dentist if somebody stresses that they are more susceptible to oral diseases. In relation to tobacco use, 87.9% (n=116) considered a more harmful effect at the gingiva of patients with diabetes compared to normal subjects (Table 2).

When asked whether they had any oral condition, 57.5% reported that they did not have any oral disturbances at that moment. In contrast, intraoral clinical examination showed that 99% of the

sample had at least one type of oral condition such as carious lesions, plaque/calculus, gingival inflammation, tooth mobility, residual root or xerostomia.

The intraoral examination revealed that the most prevalent condition was the presence of plaque and calculus (77%; n=102) followed by gingival inflammation (66%; n=87). In addition, dry mouth sensation was present in 65% (n=86) of the participants (Figure 1).

Discussion

One the main goals of this study was to evaluate whether physicians advise their patients about DM implications on oral health. Since the patients often receive DM definitive diagnosis by physicians it was important to access such issue (Haas et al., 2013). The results reveals that 54% of diabetic patients had never been delivered any information from their physicians in this regard. Moreover, the same percentage was unaware about the bidirectional relation between PD and DM. These data are consistent with results reported by previous studies (Moore et al., 2000; Sandberg et al. 2001; Mirza et al., 2007; Allen et al., 2008; Yuen et al., 2010). Sandberg et al. (2001) found that 85% of DM patients were not instructed about the connection between DM and oral health; 83% assumed that DM had no influence on oral health status and 47.7% reported that their dentists were unaware about the diabetes diagnosis of the studied subjects. Other study showed that 32% of diabetic subjects recognize that the disease could influence the oral health status (Jansson et al., 2006). Mirza et al. (2007) observed that 35.4% of patients are aware that DM might affect oral health. In contrast, the physicians had advised only 17.7% of them in this regard. In the same study, 57% of the subjects had a lack of knowledge that DM predisposes for development of oral diseases and 7.6% stated that there is no relationship between diabetes and oral health. In a study with 405 Jordanian diabetic patients, 48% of the sample was aware DM increases the incidence of PD and oral alterations (Lamster et al., 2008).

These above-mentioned data indicate the lack of major integration with physician, dentists and health professionals related to DM and oral health. Therefore, this evidence highlights the need of dentists amongst the members of the task force of the National Standards for Diabetes Self-Management Education, as well as in multidisciplinary staff at diabetes care centers, since it is well established the bidirectional relationship between DM and oral diseases.

The majority of the participants of our study stated awareness towards the fact that DM increases the chances for oral diseases and that oral health would be better if they did not have diabetes. However, it is not rare that people use to search curative care rather than preventive (Hemenway, 2010). Thus, further studies should be performed in order to provide more evidence whether diabetic patients have a preventive behavior or rather search professional care only after having some oral problem.

Although most of the subjects reported that they would search for a dentist in case of oral problems, 5% would practice self-medication and 30% would look for a physician. These findings show that not all patients were aware about the appropriate professional to search in the case of any oral concern. One possible explanation related to our sample is the higher public access to medical care than to dentistry clinics.

In the current study, 35.6% did not know which type of DM they had. Such finding needs to be stressed since it supports the lack of patients' awareness regarding their own health. This result might be one of the reasons for few adherence rate to preventive measures (Mizra et al., 2007) and treatments, leading to adverse health effects that could result in loss of quality life and onset of DM comorbidities.

Another important result is that more than a half of the patients presumed to have no oral alterations. On the other hand, the intraoral examination revealed that 99% of the patients had some type oral problem and only one edentulous patient presented no alteration. Based on such evidence, it is clear that diabetic subjects are unaware regarding their real oral status. The lack of perception of early oral problems in patients with uncontrolled glycemic levels may lead to clinically important complications. For instance, attachment loss intensifying the periodontal damage might occurs resulting in decreased immunological response and allowing the development of opportunistic infections. Furthermore, it may affect wound healing/repair and increases the propensity of peripheral neuropathy.

When study participants were asked about the higher vulnerability to oral diseases, half of the patients answered that they would increase the frequency of tooth brushing, while 5% would maintain their normal routine, and 44% would seek a dentist. Similar results had been previously reported (Eldarrat, 2011) in which 45% of DM patients would increase the brushing frequency and 31.5% would maintain their routine, whereas 23% would consult a dentist. These findings support some interesting points. First, diabetic subjects assume that oral diseases are generally related to oral hygiene. In addition, most of diabetic patients do not perceive their own oral alterations and are not collaborative to look for a dentist in order to reach a more appropriate diagnosis.

Regarding dry mouth sensation, 65% had experienced xerostomia and also reported that they did not know any consequences of hyposalivation on oral health, such as a higher incidence of caries, periodontal disease, and fungal lesions. In this respect, it is important that health professionals advise and guide DM patients to keep their mouth always hydrated by stimulating the flow of saliva and proper water intake. It is known that saliva plays an essential role in the oral homeostasis and has several functions such as cleaning the oral cavity, moistening solid foods, enable the formation of a food bolus, buffering capacity, antimicrobial and digestive components.

The presented findings indicated that 87.9% of the patients reported that the smoking habit is more harmful in diabetics than in non-diabetic subjects. These results are consistent with previous studies that evaluated the influence of smoking and type 2 DM on PD (Orbak et al., 2002; Syrjälä et al, 2003). It is known that periodontitis is more severe in patients with type 2 DM compared to non-diabetic patients and that the periodontal status is worse in smokers than in non-smokers (Orbak et al., 2002). Moreover, the association of poor metabolic control and smoking led to greater periodontal attachment loss in patients with type 1 diabetes (Syrjälä et al, 2003).

Diabetes-related oral comorbidities could be prevented health professionals, patients and their relatives if such interconnection was properly addressed. Therefore, it is of the utmost importance that physicians, dentists, nurses, and all health care providers correctly advise DM patients about the control and prevention of oral complications. Dentists should be part of the staff of the education

process in both clinical practice and public institutions, in order to improve the quality of these patients' lives, playing a decisive role in the progression of the disease. The early detection and treatment of dental caries, PD and other oral problems are critical to safeguard DM patients from oral complications associated with the disease.

Conclusion

According to present findings, DM patients need to be more advised about the relationship between diabetes and oral health status. There is a massive difference between the real oral status and participants' perception of their oral health. In addition, health care professionals usually neglect the oral status in diabetic patients. Considering that physicians are usually in charge of the reaching the definitive DM diagnosis, they play an important role in promoting oral health in these patients.

References

1. International Diabetes Federation. The IDF Diabetes Atlas. Sixth Edition. Brussels: International Diabetes Federation. 2013. <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>. Accessed on April 15, 2015.
2. Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, López-López J, Martín-González J, Velasco-Ortega E et al. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17:e356–e361. doi:10.4317/medoral.17452
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.. *New Engl J Med* 1993;329:977-986. doi: 10.1056/NEJM199309303291401
4. Skamagas M, Breen T, LeRoith D. Update on diabetes mellitus: Prevention, treatment, and association with oral diseases. *Oral Dis* 2008;14:105-114. doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01425.x.
5. Mellado-Valero A, Ferrer García JC, Herrera Ballester A, Labaig Rueda C. Effects of diabetes on the osseointegration of dental implants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E38-43.
6. Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc.* 2008;139:19S-24S.
7. Burt B. Position paper: Epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol.* 2005;76:1406-1419. doi:10.1902/jop.2005.76.8.1406.
8. Nesse W, Abbas F, Van Der Ploeg I, Spijkervet FKL, Dijkstra PU, Vissink A. Periodontal inflamed surface area: Quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol* 2008;35:668-673. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01249.x.
9. Ebrahimi A, Nabipour I, Vahdat K, Jafari SM, Fouladvand M, Assadi M et al. High sensitivity c-reactive protein is associated with the metabolic syndrome independent to viral and bacterial pathogen burden. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;84:296-302. doi: 10.1016/j.diabres.2009.03.010.

10. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann WG, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2009;36:765-774. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01445.x.
11. Corbella S, Francetti L, Taschieri S, Siena F, Fabbro MD. Effect of periodontal treatment on glycemic control of patients with diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Investig* 2013;4:502-509. doi: 10.1111/jdi.12088.
12. Al-Habashneh R, Barghout N, Humbert L, Khader Y, Alwaeli H. Diabetes and oral health: doctors' knowledge, perception and practices. *J Eval Clin Pract* 2010;16:976-980. doi: 10.1111/j.1365-2753.2009.01245.x.
13. Mata A, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita M, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem* 2004;261:137-142. dx.doi.org.ezp-prod1.hul.harvard.edu/10.1023/B:MCBI.0000028748.40917.6f
14. Khovichunkit SO, Suwantuntula T, Thaweboon S, Mitirattanakul S, Chomkhakhai U, Khovichunkit W. Xerostomia, hyposalivation, and oral microbiota in type 2 diabetic patients: A preliminary study. *J Med Assoc Thai* 2009;92:1220-1228.
15. Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res* 1987;66:623-627.
16. de Almeida Pdel V, Gregio A, Machado M, De Lima A, Azevedo LR. Saliva composition and functions: A comprehensive review. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:72-80.
17. Haas L, Maryniuk M, Beck J, Cox CE, Duker P, Edwards L, et al. National standards for diabetes self-management education and support. *Diabetes Care* 2013;36:S100-108. doi: 10.2337/dc13-S100.
18. Moore PA, Orchard T, Guggenheimer J, Weyant RJ. Diabetes and oral health promotion: A survey of disease prevention behaviors. *J Am Dent Assoc.* 2000;131:1333-1341.
19. Allen EM, Ziada HM, O'Halloran D, Clerehugh V, Allen PF. Attitudes, awareness and oral health-related quality of life in patients with diabetes. *J Oral Rehabil* 2008;35:218-223. doi: 10.1111/j.1365-2842.2007.01760.x.
20. Eldarrat A. Awareness and attitude of diabetic patients about their increased risk for oral diseases. *Oral Health Prev Dent* 2011;9:235-241.
21. Sandberg GE, Sundberg HE, Wikblad KF. A controlled study of oral self-care and self-perceived oral health in type 2 diabetic patients. *Acta Odontol Scand* 2001;59:28-33. doi:10.1080/000163501300035742.
22. Mirza KM, Khan AA, Ali MM, Chaudhry S. Oral health knowledge, attitude, and practices and sources of information for diabetic patients in lahore, pakistan. *Diabetes Care* 2007;30:3046-7. doi:10.14219/jada.archive.2000.0388.
23. Jansson H, Lindholm E, Lindh C, Groop L, Bratthall G. Type 2 diabetes and risk for periodontal disease: A role for dental health awareness. *J Clin Periodontol* 2006;33:408-14. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.00929.x.

24. Yuen HK, Marlow NM, Mahoney S, Slate E, Jenkins C, London S. Oral health content in diabetes self-management education programs. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;90:e82-e84. doi: 10.1016/j.diabres.2010.09.020.
25. Hemenway D. Why we don't spend enough on public health. *New Engl J Med*. 2010;362:1657-1658. doi: 10.1056/NEJMp1001784.
26. Orbak R, Tezel A, Çanakçı V, Demir T. The influence of smoking and non-insulin-dependent diabetes mellitus on periodontal disease. *J Int Med Res* 2002;30:116-125. doi: 10.1177/147323000203000203.
27. Syrjälä A-MH, Ylöstalo P, Niskanen MC, Knuutila MLE. Role of smoking and HbA1c level in periodontitis among insulin-dependent diabetic patients. *J Clin Periodontol*. 2003;30:871-875. doi: 10.1034/j.1600-051X.2003.00396.x.

Table 1 – Demographic characteristics of the sample (n = 132)

Demographic characteristics	
Age (mean ± SD*) (years)	56 ± 27
Range	29 – 83
Gender (male/female)	58/74
Smokers (%)	8.3
Type of diabetes (%)	
Type 1	2.3
Type 2	56.8
Gestational	0.8
Pre-diabetes	4.5
Unaware	35.6

*SD = standard deviation

Table 2 – Results of the self-applied questionnaire about knowledge, attitudes and practices of oral health

Questions	Results (%)
1) Did any physician advise you that diabetes could cause oral problems?	
Yes	
No	43
I don't know	54
	3
2) Do you think diabetic patients are more vulnerable to oral diseases?	
Yes	66
No	9
I don't know	25
3) Do you have any oral and/or dental problem?	
Yes	41
No	57.5
I don't know	1.5
4) If yes, do you think it is due to diabetes?	
Yes	48.2
No	17.9
I don't know	33.9
5) What should you do if you have any oral problem?	
Seek a doctor	29.5
Seek a dentist	62

Self-medication	5
Ignore it	3.5
6) What would you do if somebody tells that you are more vulnerable to oral diseases?	
Increase the frequency of tooth brushing	51
Reduce the frequency of tooth brushing	0
Maintain normal routine	5
Seek a dentist	44
7) Do you believe that your oral health would be better if you had not diabetes?	
Yes	69.7
No	17.4
I don't know	12.9
8) Do you think smoking is more harmful to the gingiva of diabetic patients compared to non-diabetic patients?	
Yes	87.9
No	6.8
I don't know	5.3
9) How many times do you brush your teeth (each day)?	
Never	1.5
Once a day	4.5
Twice a day	35
Three times per day or more	59
10) Do you use dental floss on daily basis?	
Yes	42
No	58
11) Are you satisfied with your oral health?	
Yes	46
No	54
12) Do you have the sensation of dry mouth?	
Yes	65
No	35

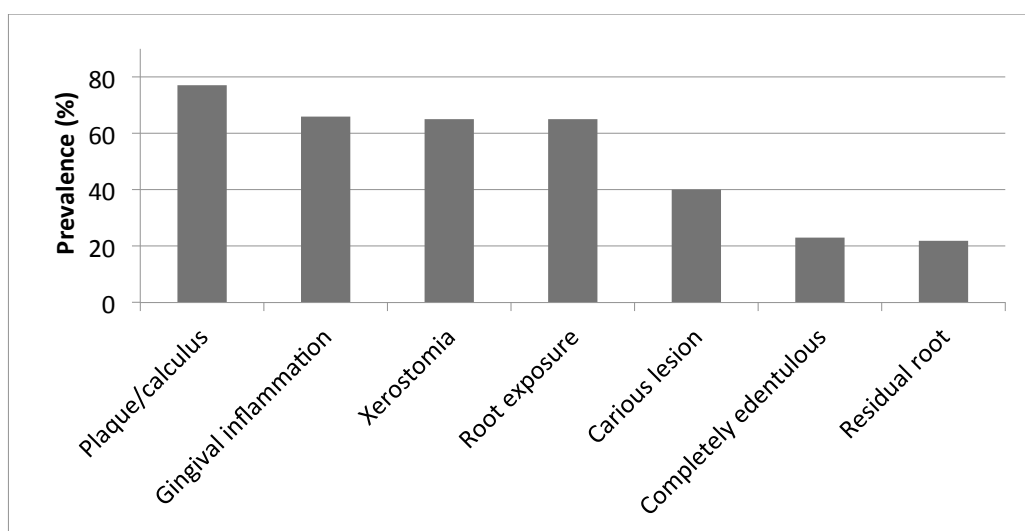


Figure 1 - Main oral alterations identified by visual inspection in patients with DM.

Anexos

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Brasília, 17 de junho de 2015.

Ofício CEP/UCB nº 023/2015

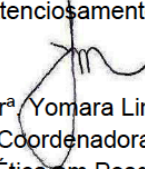
Prezados senhores,

Informamos que o projeto sob o título **Avaliação da Atividade Funcional das Glândulas Salivares de Portadores de Diabetes Mellitus Tipo 2 e sua Correlação com a Concentração e o Perfil Genético da Cromogramia** da pesquisadora Evelyn Mikaela Kogawa foi aprovado por este CEP em sua 129^ª Reunião Ordinária, realizada em 2012.

Informamos que para efeito de publicação, o presente projeto encontra-se registrado sob o N.º. **CEP.160/11**

Esperando poder servi-los em outra ocasião, apresentamos nossos votos de estima e consideração.

Atenciosamente,


Prof.ª Dr.ª Yomara Lima Mota
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa – UCB

Ilma Sr.ª.
Evelyn Mikaela Kogawa
Brasília – DF
NESTA

ANEXO B - PERIOGRAMA

	Profundidade de sondagem						Recessão Gingival						Mob.	Furca	MQ	IS	OBS/	IPi	
	DV	V	MV	DL	L	ML	DV	V	MV	DL	L	ML							
18																	X		X
17																	X		X
16																	X		X
15																	X		X
14																	X		X
13																	X		X
12																	X		X
11																	X		X
21																	X		X
22																	X		X
23																	X		X
24																	X		X
25																	X		X
26																	X		X
27																	X		X
28																	X		X
38																	X		X
37																	X		X
36																	X		X
35																	X		X
34																	X		X
33																	X		X
32																	X		X
31																	X		X
41																	X		X
42																	X		X
43																	X		X
44																	X		X
45																	X		X
46																	X		X
47																	X		X
48																	X		X

IP: _____ %
 IS: _____ %

Apêndices

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

Dados Clínicos

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE		
Nome:		
Data de nascimento: / /	Naturalidade:	
Estado civil:	RG:	
Grau de escolaridade:	Ocupação:	
Endereço:		
Bairro:	Cidade:	CEP:
Telefones para contato:		
Gênero: (1) masculino (2) feminino		
Idade: (0) 10 a 20 anos (1) 21 a 30 anos (2) 31 a 40 anos (3) 40 a 50 anos (4) 51 a 60 anos (5) mais de 61 anos		
() Diabetes tipo 1 () Diabetes tipo 2 () Síndrome de Sjogren Primária () Síndrome de Sjogren Secundária		

HÁBITOS	
Tabagista (0) não (1) sim (3) ex-fumante	Há quanto tempo? (0) Menos de um ano (1) de 1 ano a 2 anos (2) mais de 2 anos
Etilista (0) não (1) sim (3) ex-etilista	Há quanto tempo? ___anos

HISTÓRIA DA DOENÇA		
Há quanto tempo tem o diagnóstico da doença? (0) Menos de um ano (1) de 1 ano a 2 anos (2) mais de 2 anos		
Doenças/complicações concomitantes:		
() Hipertensão arterial	() Depressão/ ansiedade () Fibromialgia	
() Dislipidemia	() Coma hiperosmolar () Disfunção erétil ou secura vaginal	
() Obesidade: IMC _____		
() Retinopatia: _____		
() Nefropatia: _____		
() Neuropatia: _____		
() Amputação: _____		
() Artralgia ou mialgia		
() Disfagia ou dispepsia		
() Outras: _____		
Tratamento medicamentoso:		
Medicação	Dose	Tempo de uso
() Outros		

Antecedentes familiares: (0) Mãe (1) Pai (2) Avós paterno (3) Avós materno

EXAME FÍSICO		
PA: _____ x _____ mmHg	FC: _____ bpm	FR: _____ mpm
Peso: _____ Kg	Altura: _____ m	IMC: _____

BIOQUÍMICA	
Glicose	Hb glicosilada

Principais sintomas orais associados com alterações do funcionamento de glândulas salivares:
Apresenta sede frequente? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Tem dificuldade de mastigar alimentos secos? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Tem dificuldades em falar? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Tem necessidade de tomar água enquanto come? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Levanta a noite para beber água? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Apresenta ou já apresentou perda () ou alteração () do paladar? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Tem inchaço das glândulas salivares, recorrente ou persistente? (0) Não (1) Sim
Faz uso de medicamento para aliviar ou tratar os sintomas de boca seca? (0) Não (1) Sim Qual? _____ Dose: _____
Análise da queixa de boca seca:
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sem queixa (1) Sintomas leves de boca seca ao levantar ou durante a noite (2) Queixa de boca seca durante vários períodos do dia, mas não compromete as funções de deglutição ou fala (3) Queixa de boca seca com certo grau de comprometimento de deglutição e fala (4) Queixa de boca seca durante todo dia, disfunção severa ou incapacidade para deglutir qualquer tipo de alimentos.
Ardência bucal:
Na língua: (0) não (1) sim Intensidade: (0) fraca (1) media (2) forte Na bochecha: (0) não (1) sim Intensidade: (0) fraca (1) media (2) forte Nos lábios: (0) não (1) sim Intensidade: (0) fraca (1) media (2) forte
Faz Uso de medicação para aliviar ou tratar os sintomas de boca seca? (0) Não (1) Sim Qual? _____ Dose: _____

Principais sintomas oculares associados com alterações do funcionamento de glândulas lacrimais:
Apresenta sensação secura nos olhos? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 mês a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano

Apresenta a sensação de que tem areia nos olhos? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 mês a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Apresenta irritações oculares, olhos vermelhos e dolorosos? (0) Não (1) Sim Com que frequência? (0) sempre (1) algumas vezes (2) raramente
Tem sensação de peso nos olhos ou dificuldade de piscar? (0) Não (1) Sim Com que frequência? (0) sempre (1) algumas vezes (2) raramente
Tem dificuldade de enxergar com muita luz (fotofobia)? (0) Não (1) Sim Com que frequência? (0) sempre (1) algumas vezes (2) raramente
Apresenta diminuição da acuidade visual (miopia/hipermetropia)? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 mês a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Usa colírio lubrificante mais de 3 vezes ao dia? (0) Não (1) Sim

Principais sintomas de alteração de pele (xerodermia)
Apresenta ressecamento da pele? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 mês a 6 meses (1) de 7 meses a 1 ano (2) mais de 1 ano
Tem sensação de coceira ou prurido na pele? (0) não (1) sim Intensidade: (0) fraca (1) media (2) forte
Apresenta lesões de pele como fissuras ou mancha vermelhas? (0) Não (1) Sim Com que frequência? (0) sempre (1) algumas vezes (2) raramente

Principais sintomas de neuropatias distais
Apresenta sensação de formigamento ou dormência em alguma parte do corpo? (0) Não (1) Sim Onde? Com que frequência? (0) sempre (1) algumas vezes (2) raramente
Apresenta maior sensação de dor nos membros inferiores? (0) Não (1) Sim Em qual parte? Com que frequência? (0) sempre (1) algumas vezes (2) raramente
Apresenta diminuição ou ausência da transpiração? (0) Não (1) Sim Há quanto tempo? (0) de 0 mês a 6 meses (1) de 7 a 1 ano (2) mais de 1 ano
Apresenta alguma alteração no seu desempenho sexual? (0) Não (1) Sim Qual? Há quanto tempo? (0) de 0 mês a 6 meses (1) de 7 a 1 ano (2) mais de 1 ano

Coletas dos fluxos salivares:

___/___/___ STR: _____, STE: _____, SLS: _____

APENDICE B- Escala visual analógica

1. Marque a dificuldade que você tem para falar devido à secura

(0) _____ (10)
 Não é difícil Muito difícil

2. Marque a dificuldade que você tem para engolir devido à secura

(0) _____ (10)
 Não é difícil Muito difícil

3. Marque a quantidade de saliva na sua boca

(0) _____ (10)
 Muita saliva Nenhuma saliva

4. Marque a secura da sua boca

(0) _____ (10)
 Não é seca Muito seca

5. Marque a secura da sua garganta

(0) _____ (10)
 Não é seca Muito seca

6. Marque a secura dos seus lábios

(0) _____ (10)
 Não são secos Muito secos

7. Marque a secura da sua língua

(0) _____ (10)
 Não é seca Muito seca

8. Marque o grau da sua sede

(0) _____ (10)
 Não sinto sede Sinto muita sede

APÊNDICE C – FICHA ODONTOLÓGICA DE CPOD

FICHA ODONTOLÓGICA

Índice CPOD

Quadro 1- Resumo dos códigos e critérios para CPO/D

Código		Condição	Critério
Dentes Permanentes			
Coroa	Raiz		
0	0	Hígido	Não há evidência de cárie. Estágios iniciais da doença não são levados em consideração. Os seguintes sinais devem ser codificados como <i>hígidos</i> : <ul style="list-style-type: none"> • manchas esbranquiçadas; • manchas rugosas resistentes à pressão da sonda CPI; • sulcos e fissuras do esmalte manchados, mas que não apresentam sinais visuais de base amolecida, esmalte socavado, ou amolecimento das paredes, detectáveis com a sonda CPI; • áreas escuras, brilhantes, duras e fissuradas do esmalte de um dente com fluorose moderada ou grave; • lesões que, com base na sua distribuição ou história, ou exame táctil/visual, resultem de abrasão. Raiz Hígida. A raiz <i>está exposta</i> e não há evidência de cárie ou de restauração (raízes não expostas são codificadas como “8”).
1	1	Cariado	Sulco, fissura ou superfície lisa apresenta cavidade evidente, ou tecido amolecido na base ou descoloração do esmalte ou de parede ou há uma restauração temporária (exceto ionômero de vidro). A sonda CPI deve ser empregada para confirmar evidências visuais de cárie nas superfícies oclusal, vestibular e lingual. <i>Na dúvida, considerar o dente hígido.</i>
2	2	Restaurado com cárie	Há uma ou mais restaurações e ao mesmo tempo uma ou mais áreas estão cariadas. Não há distinção entre cáries primárias e secundárias, ou seja, se as lesões estão ou não em associação física com a(s) restauração (ões).
3	3	Restaurado sem cárie	Há uma ou mais restaurações definitivas e inexistente cárie primária ou recorrente. Um dente com coroa colocada devido à cárie inclui-se nesta categoria. Se a coroa resulta de outras causas, como suporte de prótese, é codificada como 7.
4	Não se aplica	Perdido devido à cárie	Um dente permanente ou decíduo foi extraído por causa de cárie e não por outras razões. Essa condição é registrada na casela correspondente à coroa.
5	Não se aplica	Perdido por outras razões	Ausência se deve a razões ortodônticas, periodontais, traumáticas ou congênitas.
6	Não se aplica	Apresenta selante	Há um selante de fissura ou a fissura oclusal foi alargada para receber um compósito. Se o dente possui selante e está cariado, prevalece o código 1 (cárie).
7	7	Apoio de ponte ou coroa	Indica um dente que é parte de uma prótese fixa. Este código é também utilizado para coroas instaladas por outras razões que não a cárie ou para dentes com facetas estéticas. Dentes extraídos e substituídos por um elemento de ponte fixa são codificados, na casela da condição da coroa, como 4 ou 5, enquanto o código 9 deve ser lançado na casela da raiz.
8	8	Não erupcionado-raiz não exposta	Quando o dente permanente ou decíduo ainda não foi erupcionado, atendendo à cronologia da erupção. Não inclui dentes perdidos por problemas congênitos, trauma etc.
T	Não se aplica	Trauma (fratura)	Parte da superfície coronária foi perdida em consequência de trauma e não há evidência de cárie.
9	9	Dente excluído	Aplicado a qualquer dente permanente que não possa ser examinado (bandas ortodônticas, hipoplasias graves etc.).

APÊNDICE D - Proporção das categorias de medicamentos (divididos de acordo com o grupo principal e subgrupos da classificação ATC) utilizados por cada grupo estudado e sua relação com as taxas de hipossalivação da STR. A hipossalivação da STR foi considerada valores <0,1 ml/min.

ATC	Hipossalivação do fluxo salivar em repouso (ml/min)												
	Medicamentos ATC grupos	Controle				DM tipo 2 compensados				DM tipo 2 descompensados			
		Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)	Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)	Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)
A-Trato alimentar e metabolismo	Medicamentos para úlcera péptica e doenças de refluxo gastroesofágico (A02BC)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	1	1	0,524	2,40 (0,14-1,73)
	Insulinas e análogos (A10AB, A10AC, A10AD, A10AE)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	2	12	0,092	1,40 (1,14-1,73)
	Hipoglicemiantes orais (A10BA, A10BB, A10BD, A10BH)	0	0	N/A	N/A	8	23	0,603	0,52 (0,07 – 3,71)	11	20	0,295	N/A
	Vitamina D (A11CC)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A
	Cálcio (A12AA)	0	2	0,999	N/A	1	1	0,484	2,78 (0,16–49,22)	0	0	N/A	N/A
grupos	Agentes	0	0	N/A	N/A	1	7	0,397	0,30	2	5	0,641	0,89

	antitrombóticos (B01AC)								(0,03 – 2,83)				(0,14 – 5,48)
	Ácido fólico e derivados (B03BB)	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	0	1	0,694	N/A
C- Sistema cardiovascular	Diuréticos (de teto baixo), tiazídicos (C03AA)	0	0	N/A	N/A	0	3	0,545	N/A	0	3	0,322	N/A
	Diuréticos (de teto baixo), excluindo tiazidas (C03BA)	0	2	0,896	N/A	0	8	0,076	N/A	1	4	0,510	0,53 (0,05 – 5,33)
	Diuréticos (de teto alto) (C03CA)	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	0	1	0,694	N/A
	Betabloqueadores (C07AB)	0	0	N/A	N/A	1	4	0,999	0,61 (0,06 – 6,25)	1	2	0,678	1,15 (0,09-14,19)
	Agentes betabloqueadores e outros anti-hipertensivos (C07FA)	0	0	N/A	N/A	0	2	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A
	Bloqueadores	0	1	0,999	N/A	1	4	0,999	0,61		1	4	0,510

seletivos dos canais de cálcio com efeitos principalmente vasculares (C08CA)									(0,06 – 6,25)				(0,05-5,33)
Inibidores da enzima conversora da angiotensina, monodroga (C09AA)	0	1	0,999	N/A	2	8	0,689	0,56 (0,10 – 3,27)	3	5	0,678	1,5 (0,10 – 3,27)	
Inibidores da enzima conversora da angiotensina, associações (C09BA)	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	0	1	0,694	N/A	
Antagonistas da angiotensina II, monodroga (C09CA)	0	3	0,846	N/A	4	6	0,413	2,22 (0,47–10,57)	1	1	0,524	2,4 (0,14-42,26)	
Antagonistas da angiotensina II, associações (C09DB)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A	
Agentes modificadores de	0	1	0,999	N/A	2	4	0,999	1,38 (0,21 – 9,02)	4	2	0,057	6,57 (0,99-43,78)	

	lipídeos, simples (C10AA, C10AB)													
D- Dermatológicos	Antissépticos e desinfetantes (D08AA)	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	1	0	0,306	N/A	
G- Sistema geniturinário e hormônios sexuais	Estrógenos (G03CA)	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	
	Medicamentos utilizados na hiperplasia prostática benigna (G04CA)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A	
H- Preparações normonais para uso sistêmico	Corticoides para uso sistêmico, monodrogas (H02AB)	0	0	N/A	N/A	1	0	0,278	N/A	0	0	N/A	N/A	
	Preparações tireóideas (H03AA)	0	0	N/A	N/A	2	5	0,999	1,05 (0,17 – 6,55)	0	2	0,475	N/A	
M- Sistema musculoesquelético	Anti-inflamatórios e antirreumáticos, não esteroidais (M01AC, M01AX)	0	0	N/A	N/A	2	0	0,071	N/A	1	0	0,306	N/A	

	Medicamentos afetando a estrutura óssea e mineralização (M05BA)	0	1	0,999	N/A		0	1	0,999	N/A		0	0	N/A	N/A
N- Sistema nervoso	Preparações antieméticas (N02CX)	0	0	N/A	N/A		0	0	N/A	N/A		1	1	0,524	2,4 (0,14-42,26)
	Antiepiléticos (N03AB, N03AE, N03AF, N03AX)	0	0	N/A	N/A		1	2	0,999	1,33 (0,11-16,57)		0	0	N/A	N/A
	Antipsicóticos (N05AH)	0	0	N/A	N/A		0	1	0,999	N/A		0	0	N/A	N/A
	Ansiolíticos (N05BA)	0	1	0,999	N/A		0	2	0,999	N/A		0	0	N/A	N/A
	Antidepressivos (N06AA, N06AB)	0	2	0,999	N/A		1	2	0,999	1,33 (0,11-16,57)		0	0	N/A	N/A
S- Órgão dos sentidos	Anti-infecciosos (S01AE)	0	0	N/A	N/A		1	0	0,278	N/A		0	0	N/A	N/A
	Preparações antiglaucoma e mióticos (S01EE)	0	0	N/A	N/A		0	1	0,999	N/A		0	0	N/A	N/A
	Outros oftalmológicos (S01XA)	0	0	N/A	N/A		0	1	0,999	N/A		0	0	N/A	N/A

N/A = não se aplica, OR = odds ratio (razão de chances), IC= intervalo de confiança

APÊNDICE E - Proporção das categorias de medicamentos (divididos de acordo com o grupo principal e subgrupos da classificação ATC) utilizados por cada grupo estudado e sua relação com as taxas de hipossalivação da STE. A hipossalivação da STE foi considerada valores <0,7 ml/min.

ATC	Hipossalivação do fluxo salivar estimulada (ml/min)												
	Medicamentos ATC grupos	Controle				DM tipo 2 compensados				DM tipo 2 descompensados			
		Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)	Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)	Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)
A-Trato alimentar e metabolismo	Medicamentos para úlcera péptica e doenças de refluxo gastroesofágico (A02BC)	0	0	N/A	N/A	1	0	0,361	N/A	2	0	0,216	N/A
	Insulinas e análogos (A10AB, A10AC, A10AD, A10AE)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	7	7	0,530	1,20 (0,31–4,59)
	Hipoglicemiantes orais (A10BA, A10BB, A10BD, A10BH)	0	0	N/A	N/A	11	20	0,999	0,83 (0,12 – 5,71)	16	15	0,342	4,27 (0,43-42,63)
	Vitamina D (A11CC)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A
	Cálcio (A12AA)	0	2	0,999	N/A	0	2	0,525	N/A	0	0	N/A	N/A
órgãos hemat	Agentes antitrombóticos	0	0	N/A	N/A	2	6	0,682	0,52 (0,09-3,03)	2	5	0,251	0,37 (0,06-2,25)

(C08CA)														
Inibidores da enzima conversora da angiotensina, monodroga (C09AA)	0	1	0,999	N/A		4	6	0,999	1,26 (0,28 – 5,65)		2	6	0,153	0,29 (0,49 – 1,69)
Inibidores da enzima conversora da angiotensina, associações (C09BA)	0	0	N/A	N/A		0	0	N/A	N/A		0	1	0,528	N/A
Antagonistas da angiotensina II, monodroga (C09CA)	1	2	0,467	2,42 (0,19 – 31,15)		5	5	0,440	2,25 (0,51 – 10,02)		2	0	0,216	N/A
Antagonistas da angiotensina II, associações (C09DB)	0	0	N/A	N/A		0	1	0,999	N/A		0	0	N/A	N/A
Agentes modificadores de lipídeos, simples (C10AA, C10AB)	1	0	0,184	N/A		2	4	0,999	0,86 (0,14 – 5,51)		2	4	0,386	0,5 (0,08 – 3,16)

D- Dermatológicos	Antissépticos e desinfetantes (D08AA)	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	1	0	0,472	N/A
	Estrógenos (G03CA)	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A
U- Sistema geniturinário e hormônios sexuais	Medicamentos utilizados na hiperplasia prostática benigna (G04CA)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A
	Corticoides para uso sistêmico, monodrogas (H02AB)	0	0	N/A	N/A	1	0	0,361	N/A	0	0	N/A	N/A
R- Preparações normonais para uso sistêmico	Preparações tireóideas (H03AA)	0	0	N/A	N/A	1	6	0,382	0,24 (0,03 – 2,22)	1	1	0,729	1,13 (0,07 – 19,50)
	Anti-inflamatórios e antirreumáticos, não esteroidais (M01AC, M01AX)	0	0	N/A	N/A	1	1	0,999	1,83 (0,11 – 32,00)	1	0	0,472	N/A
M- Sistema musculoesquelético	Medicamentos afetando a estrutura e mineralização	0	1	0,999	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A

	(M05BA)													
N- Sistema nervoso	Preparações antieméticas (N02CX)	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	2	0	0,216	N/A	
	Antiepiléticos (N03AB, N03AE, N03AF, N03AX)	0	0	N/A	N/A	0	3	0,288	N/A	0	0	N/A	N/A	
	Antipsicóticos (N05AH)	0	0	N/A	N/A	1	0	0,361	N/A	0	0	N/A	N/A	
	Ansiolíticos (N05BA)	0	1	0,999	N/A	2	0	0,124	N/A	0	0	N/A	N/A	
	Antidepressivos (N06AA, N06AB)	0	2	0,999	N/A	2	1	0,539	4,00 (0,33 – 49,08)	0	0	N/A	N/A	
S- Órgão dos sentidos	Antiinfeciosos (S01AE)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A	
	Preparações antiglaucoma e mióticos (S01EE)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A	
	Outros oftalmológicos (S01XA)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A	

N/A = não se aplica , OR = odds ratio (razão de chances), IC= intervalo de confiança

APÊNDICE F - Proporção das categorias de medicamentos (divididos de acordo com o grupo principal e subgrupos da classificação ATC) utilizados por cada grupo estudado e sua relação com as taxas de hipossalivação da SLS. A hipossalivação da SLS foi considerada para valores <3,94 µl/cm²/min.

ATC	Hipossalivação do fluxo salivar labial superior (ml/min)													
	Medicamentos ATC grupos	Controle				DM tipo 2 compensados				DM tipo 2 descompensados				
		Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)	Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)	Hipossalivação (n)	Normosialia (n)	p	OR (IC)	
A-Trato alimentar e metabolismo	Medicamentos para úlcera péptica e doenças de refluxo gastroesofágico (A02BC)	0	0	N/A	N/A	1	0	0,999	N/A	1	1	0,729	0,89 (0,05-15,40)	
	Insulinas e análogos (A10AB, A10AC, A10AD, A10AE)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,472	N/A	11	3	0,015*	2,19 (1,53-3,14)	
	Hipoglicemiantes orais (A10BA, A10BB, A10BD, A10BH)	0	0	N/A	N/A	17	14	0,650	1,82 (0,27 – 12,47)	16	15	0,999	0,71 (0,10-4,86)	
	Vitamina D (A11CC)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,472	N/A	0	0	N/A	N/A	
	Cálcio (A12AA)	1	1	0,216	1,40 (0,08 – 24,20)	0	2	0,216	N/A	0	0	N/A	N/A	
g	os	Agentes	0	0	N/A	N/A	5	3	0,695	1,67	4	3	0,566	1,24

	antitrombóticos (B01AC)								(0,33 – 8,35)				(0,24-6,58)	
	Ácido fólico e derivados (B03BB)	0	0	N/A	N/A		0	0	N/A	N/A	1	0	0,526	N/A
C- Sistema cardiovascular	Diuréticos (de teto baixo), tiazídicos (C03AA)	0	0	N/A	N/A		1	2	0,593	0,42 (0,03 – 5,06)	2	1	0,543	1,88 (0,155-22,83)
	Diuréticos (de teto baixo), excluindo tiazidas (C03BA)	0	2	0,329	N/A		4	4	0,586	0,87 (0,18 – 4,18)	3	2	0,555	1,41 (0,21-9,62)
	Diuréticos (de teto alto) (C03CA)	0	0	N/A	N/A		0	0	N/A	N/A	1	0	0,528	N/A
	Betabloqueadores (C07AB)	0	0	N/A	N/A		1	4	0,167	0,18 (0,02 – 1,81)	2	1	0,543	1,88 (0,16-22,83)
	Agentes betabloqueadores e outros anti-hipertensivos (C07FA)	0	0	N/A	N/A		0	2	0,216	N/A	0	0	N/A	N/A
	Bloqueadores seletivos dos canais de cálcio com efeitos principalmente	0	1	0,999	N/A		2	3	0,650	0,55 (0,08 – 3,76)	4	1	0,342	4,27 (0,43- 42,63)

vasculares (C08CA)													
Inibidores da enzima conversora da angiotensina, monodroga (C09AA)	0	1	0,999	N/A		5	5	0,999	0,86 (0,20 – 3,69)		4	4	0,586 0,87 (0,18 – 4,18)
Inibidores da enzima conversora da angiotensina, associações (C09BA)	0	0	N/A	N/A		0	0	N/A	N/A		0	1	0,472 N/A
Antagonistas da angiotensina II, monodroga (C09CA)	1	2	0,621	0,67 (0,06-8,06)		5	5	0,999	0,86 (0,20 – 3,69)		1	1	0,729 0,89 (0,05–15,40)
Antagonistas da angiotensina II, associações (C09DB)	0	0	N/A	N/A		1	0	0,999	N/A		0	0	N/A N/A
Agentes modificadores de lipídeos, simples (C10AA, C10AB)	1	0	0,427	N/A		3	3	0,999	0,88 (0,15 – 5,05)		4	2	0,386 2,00 (0,32-12,62)

D- Dermatológicos	Antissépticos e desinfetantes (D08AA)	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	0	1	0,472	N/A
	Estrógenos (G03CA)	1	0	0,427	N/A	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A
G- sistema geniturinário e hormônios sexuais	Medicamentos utilizados na hiperplasia prostática benigna (G04CA)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A
	Corticoides para uso sistêmico, monodrogas (H02AB)	0	0	N/A	N/A	1	0	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A
H- Preparações normonais para uso sistêmico	Preparações tireóideas (H03AA)	0	0	N/A	N/A	4	3	0,999	1,24 (0,24 – 6,58)	1	1	0,729	0,89 (0,05-15,40)
	Anti-inflamatórios e antirreumáticos, não esteroidais (M01AC, M01AX)	0	0	N/A	N/A	2	0	0,487	N/A	1	0	0,528	N/A
M- Sistema musculoesquelético	Medicamentos afetando a estrutura óssea e mineralização (M05BA)	0	1	0,999	N/A	1	0	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A

N- Sistema nervoso	Preparações antienxaquecosas (N02CX)	0	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	2	0	0,271	N/A
	Antiepiléticos (N03AB, N03AE, N03AF, N03AX)	0	0	N/A	N/A	0	3	0,095	N/A	0	0	N/A	N/A
	Antipsicóticos (N05AH)	0	0	N/A	N/A	1	0	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A
	Ansiolíticos (N05BA)	0	1	0,999	N/A	1	1	0,999	0,89 (0,05 – 15,40)	0	0	N/A	N/A
	Antidepressivos (N06AA, N06AB)	1	1	0,671	1,40 (0,81-24,20)	3	0	0,231	N/A	0	0	N/A	N/A
S- Órgão dos sentidos	Antiinfeciosos (S01AE)	0	0	N/A	N/A	1	0	0,999	N/A	0	0	N/A	N/A
	Preparações antiglaucoma e mióticos (S01EE)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,472	N/A	0	0	N/A	N/A
	Outros oftalmológicos (S01XA)	0	0	N/A	N/A	0	1	0,472	N/A	0	0	N/A	N/A

N/A = não se aplica, * $P < 0,05$, OR = odds ratio (razão de chances), IC = intervalo de confiança.