

A-2 MACROGLOBULINA NA SALIVA É ASSOCIADO COM CONTROLE GLICÊMICO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

JUAN PABLO AITKEN SAAVEDRA¹; GONZALO ROJAS-ALCAYAGA²; IRENE MORALES-BOZO²; ANDREA MATURANA²; MONTSERRAT REYES²; ALEJANDRO ESCOBAR³.

¹ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas – juanpabloaitken@gmail.com

² Universidade do Chile -grojasalcayaga@yahoo.es,imorales@odontologia.uchile.cl,
montserrat.reyes.r@gmail.com,andreamaturanar@gmail.com

³ Faculdade de Odontologia-Universidade do Chile – janodvm@gmail.com

1.INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença que ameaça a saúde e a economia particularmente dos países em desenvolvimento (HU,2011). Pacientes com DM2 têm um risco, pelo menos, duas vezes maior de mortalidade em comparação com as pessoas saudáveis (HOLMER et al, 2013). Por este motivo, precisa de um estrito controle para evitar as complicações associadas com a sua progressão. Atualmente, o melhor método disponível para avaliar o controle da DM2 é a hemoglobina glicada (HbA1c), pois dá uma visão geral do controle glicêmico de um indivíduo a partir dos 4 meses anteriores. No entanto, este método precisa de uma amostra de sangue venoso, procedimento que pode ser invasivo e associado com aversão e baixa adesão ao tratamento (ROHLFING, et al, 2002). Neste sentido, há necessidade de identificar um rastreo alternativo, a partir de outros tipos de amostras biológicas menos invasivas, a fim de avaliar o controle glicêmico em DM2. Algumas tentativas, como a coleta de fluido gengival crevicular com sangue para testar HbA1c, demonstraram ser viáveis e aceitáveis para o rastreo de controle de DM2 em pacientes com doença periodontal (STRAUSS et al, 2012). Este procedimento, impossibilitaria avaliar o controle metabólico das pessoas desdentadas ou saudáveis periodontalmente. Até agora, não é possível medir HbA1c na saliva, porque normalmente este fluido não contém sangue. No entanto, existe evidência suficiente que estabelece que a maioria dos compostos encontrados no sangue também estão presentes na saliva (SCHAFER et al 2014). Devido a obtenção de amostras ser mais fácil, não invasiva e ter menor custo econômico, a saliva representa uma alternativa promissora como método auxiliar de diagnóstico, porque é uma rica fonte de biomarcadores. Os biomarcadores, ou marcadores biológicos, são substâncias ou entidades cuja presença indicam existência ou risco de desenvolver uma doença, bem como a resposta para uma terapia particular (SCHAFER et al 2014). Vários estudos têm demonstrado que níveis da α -2-macroglobulina (A2MG) são aumentados no sangue de pacientes com DM1 e DM2 (JAMES et al 1980; TAKADA et al, 2013). Além disso, têm sido correlacionados positivamente com percentagens de HbA1c (TURECKY et al, 1999). Foi caracterizado o proteoma salivar em DM2 e os pesquisadores descobriram que os níveis de A2MG salivar eram diferencialmente maiores na saliva de pacientes com DM2 diagnosticada ou em pacientes com estados pré-diabéticos do que em pacientes saudáveis (RAO et al, 2009). Até agora, não existem estudos que avaliem a saliva como uma fonte do A2MG como biomarcador e sua associação com controle glicêmico em DM2. Por isso, neste estudo foi investigada a relação entre A2MG salivar e HbA1c em pacientes com DM2, o que poderia ter grande potencial, beneficiando o tratamento e a avaliação do estado de progressão da doença. Também poderia impactar positivamente na qualidade de vida dos indivíduos que sofrem de DM2, considerando que é um método de coleta pouco invasivo e eventualmente mais

barato, o qual poderia significar maior adesão ao tratamento do DM2, um dos principais objetivos da saúde pública.

2. METODOLOGIA

Estudo transversal com recrutamento prospectivo. Foi realizado em conformidade com as recomendações da Declaração de Helsinki (DOMJAN et al, 2013) e foi aprovado pelo Comitê de ética da Faculdade de Odontologia da Universidade do Chile. Todos os participantes assinaram um consentimento informado. Foram recrutados prospectivamente 120 pacientes com diagnóstico de DM2 confirmado pela associação de diabéticos do Chile (ADICH) de acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde do Chile. Foram excluídos os indivíduos com doenças reumáticas, irradiados na região de cabeça e pescoço, grávidas, doentes terminais e pessoas com danos neurológicos. Foram solicitados os resultados do teste de hemoglobina glicada (HbA1c) medidos com a equipe Variant II Bio Rad, certificado para o Programa Glycohemoglobin Standardization Nacional dos Estados Unidos (HANAS, 2010). Os doentes com níveis de HbA1c <7% foram classificados como diabéticos compensados e aqueles com níveis > 7%, descompensados. Um operador previamente treinado, coletou amostras de saliva não estimuladas em um tubo de centrífuga Falcon 50 mL (BD Falcon, EUA). A partir desta saliva, foram separados 500 uL para o ensaio de imunomacroglobulina humana A2MG. A determinação foi feita usando análise com enzimas ligadas (ELISA) para medição quantitativa de alfa-2-macroglobulina (GenWayBiotech, Inc.CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As variáveis quantitativas foram expressas como média e erro padrão. O teste de correlação não paramétrico de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre HbA1c e A2MG. Curvas ROC foram construídas para determinar o poder preditivo de A2MG na saliva para diagnosticar o controle glicêmico. Valor *P* inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado o software V5.0 GraphPad Prism e Stata 11.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra do estudo consistiu em 120 pacientes com DM2, dos quais, 81 (67,5%) eram do sexo feminino e 39 (32,5%) do sexo masculino. A idade média foi de $61,6 \pm 10,1$. O índice médio de massa corporal (IMC) foi de 28,9. 45 pacientes (37,5%) exibiram um nível HbA1 inferior a 7%, ou seja, compensados, enquanto que 75 pacientes (62,5%) apresentaram nível mais elevado do que a HbA1c 7%, ou seja, descompensados. Além de ter DM2, 74 pacientes tinham também hipertensão. A correlação entre os níveis de saliva de A2MG e porcentagem HbA1 foi de $r = 0,7748$ e $P < 0,0001$.

Níveis salivares de A2MG foram significativamente maiores em DM2 descompensados em comparação com aqueles compensados ($P < 0,0001$). A área sob a curva ROC mostra o poder discriminatório da saliva para detectar A2MG em pacientes com DM2 descompensada. (AUC = 0,903 IC 95%; 0,847-0,959 e $P < 0,001$). O valor de corte de níveis de A2MG salivares ótimos para prever uma descompensação metabólica foi de 880 ng / ml (sensibilidade 81,9%, especificidade de 89,6%).

Neste estudo, nós demonstramos uma forte associação entre controle glicêmico e níveis de A2MG salivar em indivíduos com DM2. Os resultados obtidos com a curva ROC indicam que níveis salivares de A2MG poderiam ser utilizados como método de diagnóstico altamente específico para distinguir indivíduos com controle inadequado da glicemia. Nossos resultados estão em acordo com os de Rao et al., que detectaram concentrações maiores de A2MG na

sangue e saliva de pacientes em estados pré-diabético do que as encontradas em pacientes controles saudáveis (RAO et al, 2009). Até agora, nenhum estudo havia correlacionado níveis salivares de A2MG e porcentagem de HbA1c. Estudo mostrou resultados semelhantes, mas os níveis de A2MG foram detectados apenas no sangue (SOMAN et al, 2011). Contudo, há provas suficientes que a maioria dos compostos encontrados no sangue podem também ser encontrados na saliva (LLENA-PUY, 2006). A saliva contém muitas possíveis proteínas derivadas do soro em adição com as secretadas por glândulas salivares maiores e menores (WILMARTH et al, 2004). É concebível que A2MG possa ser transferido por exocitose a partir do sangue para a saliva quando está presente em níveis elevados no plasma. Além disso, estudos indicam que A2MG é elevado no sangue de pacientes com DM1 e DM2, em particular aqueles que ainda têm outras complicações devido à diabetes, como a insuficiência renal crônica (LITTLE et al, 2009). A saúde periodontal também está relacionada com os níveis salivares de A2MG. Um estudo descreveu que os níveis de A2MG no fluido crevicular são significativamente mais elevados em pacientes com periodontite agressiva em comparação com aqueles com periodontite crônica (ERTUGRUL et al, 2013). O estado periodontal não foi avaliado em nosso estudo, mesmo assim consideramos importante fazer isto num futuro estudo considerando a associação entre doença periodontal e DM2 (STRAUSS et al, 2012). Neste sentido, pode-se supor que os pacientes DM2 descompensados incluídos em nosso estudo também poderiam apresentar periodontite agressiva (PUCHER et al, 2004) o que contribuiria para os elevados níveis de A2MG detectados neste grupo. No entanto, pesquisadores previamente estabeleceram que os indivíduos desdentados com DM2 também podem ter elevadas concentrações de biomarcadores salivares associados com processos inflamatórios, incluindo A2MG (BORDER et al, 2012). Porém, antes de fazer nosso estudo, nós fizemos uma avaliação preliminar para medir os níveis de A2MG na saliva total, parótida e glândulas sublinguais. Nossos resultados demonstram que pelo menos 30% dos níveis de A2MG detectados na saliva total são provenientes das glândulas salivares maiores, resultado que é similar aos relatados por Eliasson e Carlen que apóiam a idéia que os níveis A2MG medidos na saliva são fornecidos principalmente pelas glândulas salivares maiores (ELIASSON et al, 2010).

Tem sido demonstrado que o bom controle glicêmico em DM2 reduz as doenças microvasculares e está associado à melhoria na qualidade de vida. Nossos resultados indicam uma correlação positiva entre os níveis salivares de A2MG e porcentagem de HbA1c mostrando uma possível estratégia complementar para controlar a diabetes utilizando as amostras salivares. Então, uma visita ao dentista poderia ser uma oportunidade de obter a amostra e avaliar o controle da DM2. As projeções do nosso estudo são ainda limitadas porque ele foi feito num centro de avaliação e considerando só um momento de tomada de amostra. No futuro, as pesquisas irão requerer várias medições e também deverão associar os níveis sanguíneos e salivares de A2MG.

4. CONCLUSÕES

Nosso trabalho indica uma correlação positiva entre os níveis salivares de A2MG na saliva e porcentagem de HbA1c e sugere que a medição dos níveis de A2MG na saliva representa um método alternativo promissor para avaliar o controle glicêmico e, conseqüentemente, evitar complicações e doenças associadas com o controle inadequado da DM2.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HU FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v. 34, n.6, p.1249–1257, 2011
- HOLMER HK, OGDEN LA, BURDA BU, NORRIS SL. Quality of clinical practice guidelines for glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 8, n.4 p58625, 2013
- ROHLFING CL, WIEDMEYER H-M, LITTLE RR, ENGLAND JD, TENNILL A, GOLDSTEIN DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care**, v.25, n. 2, p. 275–278, 2002.
- STRAUSS SM, TUTHILL J, SINGH G., RINDSKOPF D. MAGGIORI JA, SCHOOR R, ET AL A novel intraoral diabetes screening approach in periodontal patients: results of a pilot study. **J Periodontol**, v. 83, n. 6, p. 699–706, 2012.
- SCHAFER CA, SCHAFER JJ, YAKOB M, LIMA P, CAMARGO P, WONG DTW.. Saliva diagnostics: utilizing oral fluids to determine health status. **Monogr Oral Sci**, v. 24, p. 88–98, 2014.
- JAMES K, MERRIMAN J, GRAY RS, DUNCAN LJ, HERD R. Serum alpha 2-macroglobulin levels in diabetes. **J Clin Pathol**, v. 33, n. 2, p. 163–166, 1980
- TAKADA T, KODERA Y, MATSUBARA M, KAWASIMA Y, MAEDA T, FUJITA Y, SHICHIRI Serum monomeric α 2-macroglobulin as a clinical biomarker in diabetes, **Atherosclerosis**. May, v. 228, n.1, p.270-276, 2013.
- TURECKY L, KUPCOVA V, SZANTOVA M. Alpha 2-macroglobulin in the blood of patients with diabetes mellitus. **Bratisl Lekárske List**, v.100, n.1, p.25–27, 1999.
- RAO PV, REDDY AP, LU X, DASARI S, KRISHNAPRASAD A, BIGGS E, ET AL. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. **J Proteome Res**, v.8, n.1, p.239–245, 2009.
- DOMJAN A, KAKUR P, SANDOR J. The Helsinki Declaration at 50 years: comments on the 2013 modifications. **Legis Artis Med Új Magyar Orvosi Hírművelő**, v.24, n.3, p.152–158, 2014.
- HANAS R, JOHN G. International HbA Consensus Committee. 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. **Diabet Med**, v.27, n.7, p.737–738, 2010.
- SOMAN S, MANJU CS, RAUF AA, INDIRA M, RAJAMANICKMAN C. Role of cardiac isoform of alpha-2 macroglobulin in diabetic myocardium. **Mol Cell Biochem**, v.350, n.1, p.229–235, 2011.
- LLENA-PUY .The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. **Med Oral, Patol Oral Y Cirugía Bucal**, v.11, n.5, p.449–455, 2006.
- WILMARTH PA, RIVIERE MA, RUSTVOLD DL, LAUTEN JD, MADDEN TE, DAVID LL. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. **J Proteome Res**, v.3, n.5, p.1017–1023, 2004.
- LITTLE RR, SACKS DB. HbA1c: how do we measure it and what does it mean? **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v.16, n.2, p.113–118, 2009.
- ERTUGRUL AS ET AL. Evaluation of beta-2 microglobulin and alpha-2 macroglobulin levels in patients with different periodontal diseases. **Aust Dent J**, v.58, n.2, p.170–175 2013.
- PUCHER J, STEWART J. Periodontal disease and diabetes mellitus. **Curr Diab Rep**, v.4, n.1, p.46–50, 2004.
- BORDER MB, SCHWARTZ S, CARLSON J, ET AL. Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes. **Mol Biosyst**, v.8, n.4, p.1304–10, 2012.
- ELIASSEN L, CARLEN A. An update on minor salivary gland secretions. **Eur J Oral Sci**, v.118, n.5, p.435–442, 2010.