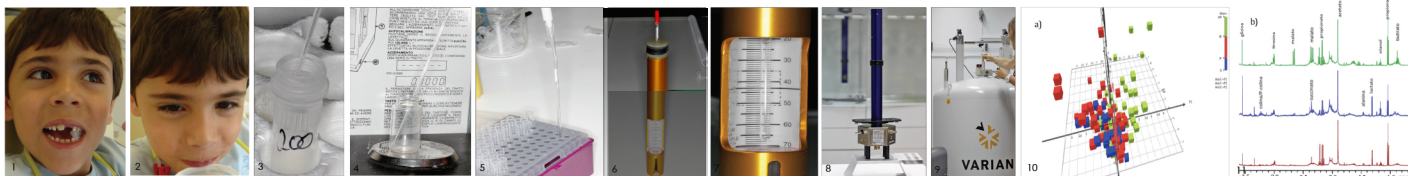


Introdução e Objetivos

A **diabetes mellitus tipo 1 (DM1)** e a saúde oral relacionam-se estrita e reciprocamente, reconhecendo-se nestas crianças uma maior susceptibilidade a patologias de natureza inflamatória e catabólica, com impacto acrescido a nível salivar. Métodos analíticos, nos quais se inclui a **¹H-RMN - Ressonância Magnética de próton**, permitem quantificar um grande número de metabolitos de diferentes biofluidos e, desta forma, identificar prováveis biomarcadores de múltiplas patologias, a par de alterações em diferentes vias bioquímicas. Especificamente na área da DM têm sido descritas algumas destas alterações, correlacionando-se perfis bioquimicamente relevantes com a expressão clínica e a ocorrência de complicações. Os autores preferendam, num âmbito alargado, realizar uma caracterização multiparamétrica da saúde oral de crianças com DM1 sendo o **perfil metabolómico salivar** umas das componentes desenvolvidas, com posterior correlação com variáveis de índole diversa (imunológica, microbiológica e comportamental).

Materiais e Métodos

Num **estudo clínico observacional analítico transversal** cumprindo os requisitos éticos exigidos foram englobadas, tendo por base critérios de inclusão/exclusão previamente definidos, **205 crianças, dos 5-15 anos, 133 com DM1 e 72 não diabéticas saudáveis**, seguidas em Endocrinologia Pediátrica e Odontopediatria. A avaliação clínica oral e a colheita padronizada de saliva estimulada (parafina, método de cuspir) foram conduzidas por um clínico experiente, sujeito a calibração prévia, contemplando o registo de diversos aspectos sociodemográficos e comportamentais, fisiológicos (fluxo e capacidade tampão salivares), patológicos (índices de cárie e de hemorragia gengival) e especificamente respeitantes à DM1 (duração, controlo metabólico). Procedeu-se a diferentes abordagens analíticas complementares (microbiológicas, imunológicas); na **caracterização metabolómica efectuada por ¹H-RMN** usaram-se 160 µL de saliva, aos quais foram adicionados 40 µL de um padrão de fumarato de sódio (10 mM, D₂O 99,9%) em tampão fosfato contendo azida sódica (NaN₃). Os espectros foram adquiridos num espectrómetro RMN Varian VNMR5 14.1 Tesla (599.72 MHz) utilizando uma sonda de detecção indireta de dupla ressonância (H,X). Os parâmetros de aquisição incluíram um pulso de radiofrequências equivalente a 45° e um tempo de aquisição de 3 seg, correspondendo a 18k pontos cobrindo uma largura espectral de 6000 Hz, uma pré-saturação de solvente (H₂O) com uma duração de 3 seg e um tempo de repetição interpolado de 12 seg. A análise espectral consistiu, inicialmente, na comparação das alturas das ressonâncias relativas a cada metabolito presente em níveis detectáveis; numa etapa posterior foi igualmente realizada a análise dos integrais das ressonâncias de metabolitos que apresentavam maior variabilidade inter-amostres. Na análise preliminar utilizaram-se as alturas de 60 ressonâncias e aplicou-se uma análise de componentes principais (PCA), com uma matriz de correlação de Spearman para um IC de 95%. Esta análise multivariada permitiu reduzir a dimensão dos dados a vectores ortogonais e, tratando-se de uma *blind analysis*, foi possível **seleccionar 8 metabolitos** que apresentavam as maiores variâncias, nomeadamente: **acetato, alanina, butirato, etanol, formato, lactato, malato e propionato**. Estes metabolitos foram então sujeitos à análise dos integrais para calcular, de forma quantitativa, a concentração de cada um, utilizando o sistema de deconvolução espectral do programa NutsPro (Acorn NMR Inc., Livermore, California, USA). Para o cálculo da concentração integrou-se a área do padrão e normalizaram-se os valores para a massa e número de prótons.



Figuras 1-7. Ilustração de alguns dos passos das técnicas de recolha, preparação e análise das amostras salivares por ¹H-RMN. Figura 10. Exemplo de uma análise PCA com os componentes principais F1, F2 e F3 (verde - saudáveis; azul - diabéticos controlados; vermelho - os diabéticos não controlados). Figura 11. Espectros ¹H-RMN típicos de salivas de indivíduos saudáveis, diabéticos tipo 1 não controlados e diabéticos tipo 1 controlados.

Após organização de resultados e categorização de variáveis procedeu-se à análise estatística através do SPSS19[®] e aplicação dos testes de correlação, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney; valores de p<0,05 foram considerados significativos para um IC de 95%.

Resultados

Dimensão	Não diabéticos	Diabéticos	HbA _{1c} ≤ 7,5	HbA _{1c} > 7,5
Média de idade (anos)	11,16 (± 2,75)	11,16 (± 3,11)	10,47 (± 3,08)	11,42 (± 3,09)
Grupos étnicos	49 (36,1%)	40 (55,1%)	35 (55,6%)	35 (59,5%)
Género	24 (18,1%)	24 (33,1%)	21 (32,6%)	27 (44,8%)

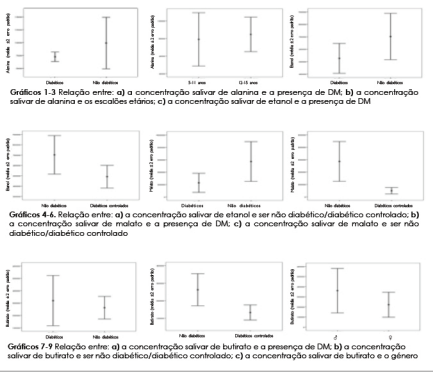
Tabela 1. Caracterização geral da amostra (n=205)

	Não diabéticos	Diabéticos	HbA _{1c} ≤ 7,5	HbA _{1c} > 7,5
Propionato (µM±sd)	0,5930±0,9256	0,7369±1,9333	0,4272±0,4202	0,8819±2,3521
Lactato (µM±sd)	0,0988±0,5631	0,0984±0,2791	0,0829±0,2177	0,1064±0,3069
Alanina (µM±sd)	0,0342±0,0698	0,0235±0,0171	0,0211±0,0155	0,0247±0,0178
Etanol (µM±sd)	0,2782±0,4997	0,1705±0,2238	0,1480±0,1264	0,1822±0,2403
Malato (µM±sd)	0,9418±2,1300	0,3491±1,4397	0,3800±0,3741	0,4689±1,7485
Butirato (µM±sd)	0,0994±0,1717	0,1037±0,3784	0,0413±0,0511	0,1346±0,4622
Acetato (µM±sd)	3,3165±4,7462	3,1161±5,3839	2,2155±1,3213	3,5820±6,5282
Formato (µM±sd)	0,6133±3,6408	0,2610±0,6292	0,1613±0,2184	0,3175±0,7555

Tabela 2. Concentração salivar média das diferentes metabolitos identificadas

A presença de DM foi significativa em determinados parâmetros constantes dos perfis metabolómicos salivares obtidos, verificando-se algumas diferenças na análise dos mesmos com destaque, nas **crianças diabéticas**, para um **acréscimo da concentração de butirato** (Mann-Whitney, p<0,001), por oposição às **não diabéticas saudáveis**, com concentrações salivares significativamente mais elevadas de **alanina** (Mann-Whitney, p=0,023), **etanol** (Mann-Whitney, p=0,001) e **malato** (Mann-Whitney, p<0,001).

A **idade** e o **género** demonstraram ser particularmente relevantes nas concentrações salivares de **alanina** (Mann-Whitney, p=0,009) e **butirato** (Mann-Whitney, p=0,013). Contrariamente ao expectável atendendo ao conjunto de processos catabólicos que ocorrem na cavidade oral, não existiram quaisquer diferenças ou associações significativas relativamente aos restantes metabolitos identificados com maior destaque - lactato, formato, propionato e acetato.



Discussão e Conclusões

Ainda que atualmente seja ponderada a existência de (pelo menos) um biomarcador metabolítico específico para cada patologia, esta assunção simplista pode ser verdadeira apenas para algumas condições. Pelos resultados obtidos **parecem existir alterações no perfil metabolómico de crianças com DM1 relativamente às não diabéticas**, distinguindo-se o **aumento de concentração de butirato nas diabéticas, e de malato, etanol e alanina nas não diabéticas**. Relativamente aos restantes metabolitos as diferenças não se mostraram significativas entre grupos, não se verificando igualmente preponderante a associação com outro tipo de parâmetros avaliados (controlo metabólico e duração da doença, frequência de escovagem dentária, taxa de fluxo salivar estimulado, capacidade tampão da saliva, índices de cárie, índice de hemorragia gengival, carga microbiológica e população linfocitária salivar). O crescimento e dinâmica do metabolismo dos diferentes microrganismos presentes na cavidade oral, a acentuada atividade metabólica das glândulas salivares, a influência hormonal e aspetos inerentes à gênese da DM1 poderão constituir parte da explicação dos resultados obtidos; não obstante, neste tipo de estudo há desde logo a ter em conta que, pelo seu desenho e cronologia, apenas foi possível **estabelecer medidas de associação ou correlação, mas não relações de causa-efeito** entre variáveis. Concomitantemente, a determinação, num período único, de vários dos parâmetros avaliados poderá não reproduzir, de forma integral, a dinâmica do verdadeiro estado de saúde oral/geral da criança. A propósito desta caracterização de biomarcadores salivares há que atender ainda a que, quer o tipo de saliva (total/glandular específica), quer o tipo de estimulação (não estimulada/estimulada) poderão condicionar os resultados e consequente interpretação. Desta forma, e assumindo a inovação e originalidade de toda a informação obtida nesta investigação de perspetivas promissoras, a mesma deve ser obrigatoriamente enquadrada e interpretada no contexto das respectivas vias bioquímicas, devidamente integrada e validada.

Bibliografia

1) Duggan CM, Rankin KN, Wagner J, Fu H, Chang D, Wejse AM, et al. Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Anal Chem* 2007;79(16):695-704. 2) Salekda I, Shekik C, Samyaly P, Shetnager K, Rankin E, Fu H, et al. Understanding the human salivary metabolome. *NMR Biomed* 2009;22(4):577-84. 3) Pihajoki NG, Costi F, Blot MS, Savelkoul H, Bakker EJ. Gender-related and age-related urinary of healthy subjects by NMR-based metabolomics. *NMR Biomed* 2008;21(12):1507-15. 4) Iqbal H, Van Ockel W, Moucha GM, Wehrli TD. Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *J Sep Sci* 2009;32(1):2185-99. 5) Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabolomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Seminbiol* 1997;21(1):118-31. 6) Guo Y, Pan L, Bi H, Hanke BC, Shandig N, Asano Y, et al. ¹H NMR metabolomic study of age profiling in children. *NMR Biomed* 2009;22(8):95-102. 7) Bao PY, Steady AF, Lu X, Doran E, Srinivasan SR, Riggs E, et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res* 2005;4(1):239-46. 8) Rugeiras P, Valente AJ. Causes of early-onset type 1 diabetes: toward diet-driven environmental approaches. *J Exp Med* 2008;205(13):2953-7. 9) Zhang S, Nagama C, Givada CA, Aizawa Y, Shiroishi N, Baraka C, Rafferty D. Comparative and quantitative ¹H NMR-based metabolomics reveals specific metabolic pathway disruptions in diabetic rats. *Anal Biochem* 2008;383(1):74-84. 10) Malvarol D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am* 2011;55(1):159-76. 11) Givada CA, Zhang S, Gu H, Aizawa Y, Shiroishi N, Rafferty D. Metabolomics-based methods for early disease diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8(5):617-33. 12) Dunn WB, Bailey NJ, Johnson JE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyt* 2006;130(5):656-55. 13) Siewczak CJ, Lynch E, Clason AM. Goodwin MC. 1H and 13C NMR spectroscopic analysis of human saliva. *J Dent Res* 2002;81(4):422-7.