



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Perspectivas do uso da saliva no diagnóstico de
doenças hiperglicemiantes

MÔNICA VIRGINIA VIÉGAS LIMA

São Luís,
2012

MÔNICA VIRGINIA VIÉGAS LIMA

**Perspectivas do uso da saliva no diagnóstico de
doenças hiperglicemiantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - Ponto Focal do Maranhão, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar
Meireles Guerra

São Luís,
2012

Lima, Mônica Virginia Viégas

Perspectivas do uso da saliva no diagnóstico de doenças hiperglicemiantes/ Mônica Virginia Viégas Lima, 2012.

88 f.

Orientadora: Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, 2013.

1.Saliva 2. Diabetes 3. Neoplasia 4.IgA 5. Glicose 6. Etnofarmacologia. I. Título

CDU: 616.379-008.64



MÔNICA VIRGINIA VIÉGAS LIMA

Perspectivas do uso da saliva no diagnóstico de doenças hiperglicemiantes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - Ponto Focal do Maranhão, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

A Banca Examinadora da defesa de Tese de Doutorado apresentada em sessão pública considerou o candidato aprovado em 18/12/2012.

Profa. Dra. Luciana Salles Branco de Almeida

Profa. Dra. Cecília Cláudia Costa Ribeiro

Profa. Dra. Fernanda Ferreira Lopes

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes Nascimento

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Orientadora

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Benedito e Fátima, pelo incentivo e por me proporcionarem uma educação direcionada para os bons valores da vida.

Ao meu esposo David pela ajuda, paciência e apoio

AGRADECIMENTOS

A Deus que guia, ilumina e protege os meus caminhos e por me proporcionar a concretização de mais uma etapa em minha vida .

A professora Rosane Nassar Meireles Guerra, pela confiança em mim depositada, orientação, amizade, incentivo e incansável apoio, e pelo exemplo de pessoa íntegra e dedicada, me passando ensinamentos desde a iniciação científica até o doutorado.

Ao João de Oliveira Júnior pela amizade, ajuda nas coletas dos dados e na realização dos ensaios bioquímicos.

A família LIF (Laboratório de Imunofisiologia- UFMA), pela amizade e apoio em cada etapa deste trabalho.

Aos amigos Renorbianos, Richard Pereira Dutra, Daniel Duarte, Lúcio Campos pela amizade e companhia em todas as viagens para cursar as disciplinas. Aos amigos que fiz durante o curso, Iracele, Selma, Andrea, Franklin.

As professoras doutoras Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, Sonia Maria de Farias Freire e Cláudia Maria Coelho Alves pelas sugestões e correções durante a qualificação que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

As equipes do Laboratório de Imunofisiologia e do Hospital Universitário da

Universidade Federal do Maranhão que propiciaram condições para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão - FAPEMA pelo apoio financeiro à pesquisa e pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos que, de forma direta e indireta, tornaram possível a realização deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofisiologia e no Hospital
Universitário da Universidade Federal do Maranhão e contou com apoio financeiro
do edital FAPEMA/CNPq/MS – PPSUS.

"Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina".

Cora Coralina

RESUMO

A saliva é um fluido biológico que vem sendo utilizado na avaliação de doenças sistêmicas, pois reflete estados de saúde e doença. Investigamos as principais alterações imunológicas e bioquímicas na saliva em pediátricos com neoplasias, em pacientes diabéticos e ainda as espécies vegetais mais utilizadas pelos diabéticos como hipoglicemiantes. Foram avaliados 2 crianças com neoplasias e 115 crianças sem neoplasia e 93 pacientes diabéticos e 49 não diabéticos. Na avaliação etnofarmacológica foram entrevistados 107 diabéticos quanto ao uso de plantas no tratamento da diabetes e sintomas associados, utilizando-se questionário padrão e entrevista semi-estruturada. A bioquímica salivar foi determinada por método colorimétrico e a produção de anticorpos IgA foi determinada por ensaio imunoenzimático - ELISA. Na avaliação odontológica utilizou-se o índice CPO-D. Crianças com neoplasias apresentaram aumento na concentração de fosfatase alcalina, T4, TSH e glicose e uma diminuição de insulina e IgA total. Glicose, uréia, cálcio, IgA total, IgA anti-mutans, IgA anti-insulina e o índice CPO-D foram maiores em pacientes diabéticos. Foram relatadas 16 espécies vegetais para tratamento do diabetes, sendo que pata de vaca, azeitona doce, insulina e tamarindo foram as mais utilizadas. Concluímos que as espécies vegetais mais frequentemente mencionadas como coadjuvantes no tratamento da diabetes apresentam eficácia cientificamente comprovada como hipoglicemiantes, e ainda que a saliva pode ser utilizados no acompanhamento de diabéticos e crianças com neoplasias e o que lança novas perspectivas no acompanhamento e no tratamento de pacientes com doenças hiperglicemiantes.

Palavras-chave: Saliva, Diabetes, Neoplasia, IgA, Glicose, Etnofarmacologia

ABSTRACT

Saliva is a useful biological fluid with potential for diagnosis and monitoring of systemic disease because it reflects states of health and disease. Our objective was to evaluate the immunological and biochemical changes in saliva of pediatric patients with cancer, in diabetic patients and to investigate which plant species are most frequently used by diabetics as hypoglycemic. In immunological and biochemical evaluations Cancer patients consisted of 32 children with cancer and 115 children without cancer and the diabetic sample consisted 93 diabetic patients and 49 non diabetic. To assess the ethnopharmacological data 107 diabetics were interviewed using a standard questionnaire and semi-structured interview. The salivary biochemistry was determined by colorimetric assays and The IgA concentration was determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA. DMFT index was employed in dental evaluation. Children with cancer showed an increase in alkaline phosphatase, T4, TSH and glucose and decreased insulin and total IgA. Glucose, urea, calcium, total IgA, IgA anti-mutans IgA anti-insulin and DMFT index was higher in diabetic patients. 16 plant species have been reported for the treatment of diabetes, and "pata de vaca", sweet olive, tamarind and insulin were the most used. We conclude the plant species most frequently mentioned have its efficacy as hypoglycemic scientifically attested and saliva can be used to monitor diabetics and cancer patients, which casts new perspectives in the monitoring and treatment of patients with hyperglycemic diseases.

Keywords: Saliva, Diabetes Mellitus, Câncer, IgA, Glucose, Ethnopharmacology.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1- Salivary concentration of total IgA, anti- <i>Streptococcus mutans</i> IgA and anti-insulin IgA in diabetic patients and healthy controls.....	47
---	----

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Quadro 1 - Critérios para o diagnóstico do diabetes.....	26
---	----

Capítulo I

Tabela 1 - Salivary parameters of diabetic and non-diabetic patients.....	46
--	----

Tabela 2 - Composition of the saliva of diabetic patients using and not using insulin.....	48
---	----

Tabela 3 - Area under the ROC curve obtained for salivary parameters of diabetic patients.....	49
---	----

Tabela 4 - Index of decayed, missing, filled permanent teeth - DMFT in diabetic patients.....	50
--	----

Tabela 5 - Data from the oral hygiene, access to dental care and feeling a dry mouth of diabetics and control patients.....	51
--	----

Capítulo II

Tabela 1 - Uso de Medicamentos e Plantas Medicinais para tratamento de Diabetes em São Luís, MA, Brasil.....	57
---	----

Tabela 2 - Uso etnofarmacológico de espécies vegetais para tratamento de diabetes mellitus em São Luís - MA, Brasil.....	58
---	----

Tabela 3 - Plantas medicinais utilizadas na forma de chá por pacientes diabéticos para tratamento de outras doenças em São Luís - MA, Brasil.....	59
--	----

Tabela 4 - Plantas medicinais citadas na entrevista que também fazem parte da relação do Ministério da Saúde do Brasil e seus respectivos usos terapêuticos.....	60
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IgA	Imunoglobulina A
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
CPO-D	Dentes permanentes cariados, perdidos e obturados
HIV	human immunodeficiency vírus
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
LADA	Latent Autoimmune Diabets in Adults
TTOG	Teste de Tolerância Oral a Glicose
SUS	Sistema Único de Saúde
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS
MS	Ministério da Saúde
HIPERDIA	Sistema de Cadastro e Acompanhamento de Hipertensos e Diabéticos do Brasil
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RPM	Rotação por minuto
SD	<i>Standard deviation</i> - Desvio Padrão
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> - característica operacional receptora
DMFT	<i>Decayed, Missing and Filled permanent Teeth</i> - dentes permanentes cariados, perdidos e obturados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Valor Diagnóstico da Saliva.....	19
2.2 Doenças Hiperglicemiantes: Câncer e Diabetes.....	20
2.3 Uso de Plantas no Tratamento da Diabetes.....	26
3 OBJETIVOS	
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4. RESULTADOS	
4.1 CAPÍTULO I: Alterações salivares em pacientes diabéticos	30
4.2 CAPÍTULO II: Espécies vegetais utilizadas por pacientes diabéticos como hipoglicemiantes em São Luís, MA.....	52
5. ARTIGO PUBLICADO: Avaliação salivar de pacientes pediátricos com câncer antes e depois do tratamento antineoplásico	74
6. CONCLUSÕES	78

REFERÊNCIAS

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido biológico dinâmico e complexo. Reflete estados de saúde e doença e, por isso, tem sido utilizada como ferramenta laboratorial para monitorar pacientes (LIMA et al, 2010). O perfil salivar tem sido utilizado para monitorar: concentrações teciduais de compostos naturais, drogas terapêuticas, ou introduzidas para fins recreativos, hormônios, componentes do sistema imunológico, componentes do sistema neurológico, além de alterações nutricionais e/ou metabólicas (LEE, 2009).

Várias patologias sistêmicas afetam a função das glândulas salivares e apresentam manifestações orais. Dessa forma, a saliva vem sendo utilizada para diagnóstico, prognóstico e acompanhamento em várias patologias, incluindo a diabetes e tumores (MOURA et al, 2007; OLIVEIRA JÚNIOR; GUERRA, 2010; GUERRA et al, 2012).

Doenças pediátricas crônicas como o câncer afetam o desenvolvimento imune levando a resultados adversos e a disfunção dos órgãos (DIETERT, 2010). Componentes da imunidade oral e sistêmica são particularmente afetados durante tratamento anti-neoplásico. Além disso o processo neoplásico por si só pode prejudicar o metabolismo da glicose (YETGIN et al, 1998).

Diabetes é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento de glicemia, conhecido como hiperglicemia, decorrente da falta de insulina ou da sua incapacidade em exercer adequadamente efeitos nos tecidos-alvos, o que cronicamente está associado à disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. A classificação clínica para o diabetes inclui: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos de diabetes (ADA, 2012).

Segundo dados da VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) o percentual de diabéticos aumentou nos últimos anos, principalmente entre os homens, passando de 4,4% em 2006, para 5,2% em 2011. Esse levantamento feito em 26 capitais e no Distrito Federal mostra que a frequência do diagnóstico prévio de diabetes foi de 5,6%, sendo de 5,2% entre homens e de 6,0% entre mulheres. Em São Luís, a frequência de adultos que referiram diagnóstico médico prévio de diabetes foi de 5,7% em homens e 3,8% em mulheres (BRASIL, 2012).

Os tratamentos mais frequentes no controle do DM incluem: dieta, exercícios, uso de antidiabéticos orais e de insulina. No entanto a insulina e outros hipoglicemiantes orais apresentam efeitos adversos, o que tem incentivado a identificação de novas drogas que possam atuar de maneira distinta em relação às drogas existentes (PALSAMY; SUBRAMANIAN, 2009). Portanto, os levantamentos etnobotânicos se constituem instrumentos importantes nas pesquisas com plantas com finalidades terapêuticas, visto que considera o uso empírico já consagrado em práticas tradicionais (GOVINDASAMY et al, 2011).

Diversas espécies vegetais têm sido usadas no tratamento da diabetes mellitus e suas complicações (LI et al, 2004). A maioria delas ao serem avaliadas farmacologicamente apresentam ação sobre o controle glicêmico, devido à presença de constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes. Entretanto, muitos efeitos hipoglicemiantes podem ser decorrentes de uma grande variedade de mecanismos, sendo que nem todos são terapeuticamente úteis no tratamento da diabetes (MARLES, FARNSWORTH,1995; SAID et al, 2002,HOU et al, 2003).

Tendo em vista o crescente uso de plantas para tratamento da diabetes pela população e que o uso da saliva pode representar uma interessante alternativa para acompanhamento dos pacientes com doenças crônicas que resultem em aumento da glicemia sanguínea, o presente trabalho avaliou as principais alterações imunológicas e bioquímicas na saliva de pacientes pediátricos com neoplasias, de pacientes diabéticos adultos e também investigou as principais espécies vegetais utilizadas no tratamento da diabetes em serviços públicos de São Luís - MA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Valor Diagnóstico da saliva

A saliva é um fluido biológico útil nos exames para diagnóstico de doenças sistêmicas ou orais, pois reflete estados de saúde e doença. Como pode ser facilmente coletada quando comparada ao sangue, o seu uso tem despertado especial interesse (MOURA et al , 2007; LIMA et al, 2010).

Dentre as vantagens em relação ao soro, merece destaque, a facilidade de coleta, armazenamento, transporte, manuseio e natureza não invasiva (KAUFMAN; LAMSTER, 2002). Um largo espectro de substâncias é encontrado na saliva, desde moléculas e íons de ocorrência natural, resultantes da atividade metabólica, hormonal, neurológica ou imunológica, até compostos introduzidos no organismo para fins terapêuticos ou recreativos (LEE et al, 2009).

A saliva total é uma mistura das secreções das glândulas salivares acrescidos de substâncias oriundas do fluido crevicular gengival, secreções brônquicas ou nasais, células epiteliais descamadas, restos de alimentos, microrganismos e os produtos de seus metabolismos (KAUFMAN; LAMSTER, 2002).

A eficácia da saliva como método alternativo tem sido avaliada, no intuito de elucidar o risco de cárie e também no diagnóstico e/ou prognóstico de doenças de várias etiologias (MOURA et al, 2007), como doenças autoimunes, doenças cardiovasculares e doenças infecciosas (PINK et al, 2009), tumores (GUERRA et al, 2012), ou como aqui para avaliar o perfil imunológico e bioquímico de pacientes com doenças hiperglicemiantes.

Em pacientes diabéticos o monitoramento e acompanhamento a partir da saliva tem se mostrado como uma alternativa promissora. A diabetes causa alterações nas glândulas salivares resultando em xerostomia, aumento de risco de infecções e alterações na composição da saliva. Devido a grande variabilidade das alterações salivares em pacientes diabéticos, não há ainda consenso quanto aos parâmetros salivares que melhor se prestam ao diagnóstico de crianças e adultos com a doença, como já ocorre com o soro (LOPEZ et al, 2003).

As imunoglobulinas presentes na saliva são oriundas de plasmócitos localizados nas glândulas salivares e em outros tecidos. Na saliva há a predominância de imunoglobulina A secretora (IgA secretora), principal componente imunológico na saliva (NAIR; SCHHROEDER, 1986).

Em pacientes pediátricos a avaliação salivar é um interessante método alternativo para avaliar os efeitos do tratamento antineoplásico pois as doenças crônicas da infância, como o câncer afetam o desenvolvimento do sistema imunitário causando disfunção do órgão (DIETERT, 2011). Além disso o tratamento antineoplásico afeta tanto o sistema endócrino como o sistema imunológico resultando em alterações na concentração salivar de imunoglobulina A (IgA) (SOUZA, 2003).

2.2 Doenças Hiperglicemiantes: Câncer e Diabetes

A prevalência mundial de tumores em crianças varia entre 0,5% a 3% de, se comparada à população em geral. No Brasil, a prevalência do câncer infantil varia de 1% a 4,6% (INCA, 2007). Entre as crianças, as leucemias, tumores do sistema nervoso central e linfomas são as neoplasias mais

frequentes. A leucemia é a neoplasia mais comum entre menores de 15 anos, principalmente a leucemia linfocítica aguda (LLA). Os tumores do sistema nervoso central predominantes no sexo masculino, ocorrem principalmente em crianças menores de 15 anos, com um pico de idade de 10 anos, e representam cerca de 20% dos tumores infantis. Já os linfomas são responsáveis pelo terceiro tipo de neoplasias malignas pediátricas, sobretudo os linfomas não Hodgkin (INCA, 2007).

O tratamento de pacientes com neoplasias inclui a rotina desde a internação da criança; procedimentos invasivos; escolha de intervenção em cada caso e medidas de suporte como a terapia nutricional, alternativas para o alívio da dor, entre outras; acompanhamento de controle da doença (PINK et al, 2009).O desenvolvimento de algumas neoplasias infantis como LLA, tumores do SNC, linfomas e sarcomas resultam em síndrome metabólica, devido tanto a deficiências hormonais como a danos farmacológicos (SIVIERO-MIACHON et al, 2008).

Numerosas funções endócrinas infantis podem ser perturbadas em decorrência de neoplasias e pelas terapias anti-câncer (MEACHAM, 2003; VAN SANTEM et al, 2005). O desenvolvimento tumoral pode resultar em perda de regulação ou na persistência de estímulos, mecanismos que levam a produção desordenada de hormônios (AMER, 2005).

Os impactos negativos da hiperglicemia em crianças sob tratamento anti-neoplásico mostram que episódios transitórios ou associados à cetoacidose diabética, estão associados ao aumento de infecções e processos inflamatórios, como pancreatite aguda ou persistente, mesmo após o fim do tratamento (BAILLARGEON et al, 2005; MOHN et al, 2004). Estes quadros se

relacionam aos prejuízos que a elevação glicêmica pode ter na mobilização de leucócitos polimorfonucleares, quimiotaxia e na atividade fagocítica – mecanismos imunológicos prejudicados pela hiperglicemia (BUTLER et al, 2005).

Diabetes mellitus (DM) é uma das principais síndromes de evolução crônica que acomete a população. A sua prevalência vem crescendo significativamente com o processo de industrialização e urbanização populacional dos últimos anos, o que tem tornado a doença um importante problema de saúde pública, sobretudo devido a elevada morbidade, mortalidade e as significativas repercussões econômicas (OLIVEIRA, 2001).

A classificação da diabetes inclui quatro classes clínicas: Tipo 1, Tipo 2, diabetes mellitus gestacional e outros tipos específicos de diabetes, devido, por exemplo: a defeitos genéticos na função das células beta β ou na ação da insulina; doenças que afetam o pâncreas, como ocorre na fibrose cística; devido ao uso de drogas ou substâncias químicas com ação imunossupressora, como ocorre no tratamento do HIV ou após transplante de órgãos. Alguns pacientes não podem ser claramente classificados como tendo tipo 1 ou diabetes tipo 2, pois a apresentação clínica da doença pode variar consideravelmente em ambos os tipos de diabetes (ADA, 2012).

Na diabetes tipo 1 a destruição das células β do pâncreas ocorre, usualmente, por processo autoimune ou, menos comumente, por outros fatores, como acidentes, tumores, infecções e intoxicações. Na diabetes autoimune ocorre insulite devido à elevação de auto-anticorpos circulantes anti-ilhotas, anti-descarboxilase do ácido glutâmico e anti-insulina (ATKINSON; MACLAREN, 1994; IMAGAWA et al, 2000).

Como consequência da perda das células β ocorre à deficiência absoluta da secreção de insulina, o que por sua vez deixa os pacientes susceptíveis à cetoacidose, muitas vezes, a primeira manifestação da doença (ADA, 2012).

A partir da década de 80, foi descrita a ocorrência de diabetes de origem autoimune de instalação insidiosa, denominado de LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*). A idade média dos pacientes com LADA é em torno dos 50 anos e por isto estes pacientes foram inicialmente classificados de forma errônea como tipo 2 (GROOP et al, 1986). A LADA compartilha com o diabetes tipo 1 a autoimunidade e a falência da secreção de insulina pelas células β . Com o diabetes tipo 2 a LADA compartilha a idade de instalação e a presença de resistência insulínica (CARLSSON et al, 2000). Por estas razões, existe a sugestão de que poderia ser considerado um terceiro tipo distinto de diabetes.

O pico de incidência do diabetes tipo 1 ocorre dos 10 aos 14 anos de idade, havendo a seguir uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos, de tal maneira que casos de diabetes tipo 1 com início após esta idade são pouco frequentes. No entanto, indivíduos de qualquer idade podem desenvolver diabetes tipo 1 (GROSS et al, 2002).

O diabetes tipo 2 é mais comum e compreende cerca de 90% dos casos de diabetes. Decorre de uma heterogeneidade de fatores, incluindo distúrbios na ação e na secreção da insulina, com predomínio de um ou outro componente (WHO, 1999). A idade de início do diabetes tipo 2 é variável, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência ao redor dos 60 anos (ERIKSSON et al, 1992). Estudos que aliam a obesidade à idade superior a 40 anos indicam este ponto de corte da idade como discriminatório entre os dois tipos de diabetes (HOTHER-NIELSEN et al, 1988).

Por outro lado, Service et al (1997) associaram a ausência de cetoacidose aguda e idade superior a 20 anos como indicadores da diabetes do tipo 2. Portanto, a idade, de forma isolada, parece não definir a classificação, mas se aliada a outras variáveis como obesidade e ausência de cetoacidose podem sugerir o tipo de diabetes. Ocasionalmente, pacientes com diabetes tipo 2 apresentam cetoacidose. Da mesma forma, pacientes com tipo 1 podem ter um início tardio e lento, com progressão inexorável da doença, apesar das características de doença autoimune. As dificuldades no diagnóstico independem da idade (ADA, 2012).

No Quadro 1 estão as taxas de glicose sanguínea utilizadas como complementar na definição e diagnóstico da diabetes.

As principais alterações bioquímicas na saliva durante a diabetes incluem variações quanto a concentração de glicose, proteínas totais, lisozima, albumina, peroxidases, eletrólitos (cálcio, sódio, potássio, cloreto, fósforo, magnésio), concentração de amilase e IgA (CARDA et al, 2006).

A medida dos anticorpos está indicada principalmente para definir o tipo de diabetes em um paciente já com o diagnóstico estabelecido, com o objetivo de evitar o início de tratamento equivocado com agentes orais em pacientes com diabetes tipo 1. Embora não haja ainda procedimento terapêutico efetivo para impedir a evolução para o diabetes, em indivíduos com auto-anticorpos séricos aumentados nos quais as alterações da glicemia ainda não ocorreram, a medida destes anticorpos pode ser útil, sobretudo em familiares de 1º grau de pacientes com diabetes tipo 1, pois pode identificar os indivíduos com maior risco de desenvolverem a doença (ADA, 2012). Nos familiares com aumento de anticorpos para 2 ou mais autoantígenos, o risco de desenvolver diabetes em 5

anos é de cerca de 70% (VERGE et al, 1996). O acompanhamento destes indivíduos permite identificar o aparecimento do diabetes precocemente, possibilita evitar episódios de cetoacidose e pode reduzir as complicações associadas a doença (GROSS et al, 2002).

Os dados quanto a concentração de IgA salivar em pacientes diabéticos são controversos embora a maioria mostre a ocorrência de aumento nas concentrações salivares de anticorpos (TENOVUO et al, 1986; YAVUZYILMAZ et al, 1996). Assim, o achado prematuro de alterações nas concentrações salivares de auto-anticorpos no diabetes tem grande valor no tratamento inicial desta patologia (OLIVEIRA JÚNIOR; GUERRA, 2010).

A cavidade bucal de indivíduos hiperglicêmicos apresenta condições propícias à ocorrência de doença periodontal e a cárie que, apesar de não comprometerem a sobrevida dos pacientes diretamente, podem interferir na qualidade de vida, deteriorar o controle metabólico, agravando, assim, outras doenças crônicas associadas (AMARAL et al, 2006).

Como a sacarose é o mais cariogênico dos açúcares, seria razoável supor que indivíduos com seu uso restrito tivessem menor ocorrência de cárie, o que efetivamente não ocorre (GALEA et al, 1986; ROSA et al, 1993). Em contrapartida, alterações quantitativas e qualitativas na saliva e na flora bacteriana oral em decorrência da diabetes podem predispor a ocorrência de cárie (ROSA et al, 1993; GALARZA OROVIO et al, 1993). Os estudos que compararam a frequência de cáries em indivíduos diabéticos e normoglicêmicos são discrepantes (TENOVUO et al, 1986; ALBRECHT et al, 1988).

QUADRO 1: Critérios para o diagnóstico do diabetes

Categoria		Glicemia (mg/dL)		
		Jejum ^a	Ao acaso ^b	2 h TTOG ^c
Glicemia normal		<99	--	<140
Pré-diabetes	Glicemia alterada	100-125	--	--
	Intolerância a glicose	--	--	≥140 e <200
Diabetes Tipo 1 e Tipo 2		≥ 126	≥ 200	≥ 200
Diabetes gestacional		≥ 110	≥ 200	≥ 140

Fonte: ADA, 2004.

a: Glicemia em jejum - ausência de ingestão calórica por pelo menos 8 horas.

b: Glicemia ao acaso: glicemia realizada em qualquer hora do dia sem levar em consideração o tempo desde a última refeição. O diagnóstico deve ser confirmado medindo a glicemia em jejum ou 2 h após o TTOG.

c: TTOG (Teste de Tolerância Oral a Glicose) - é a medida da glicemia basal e 2 horas após a ingestão de 1,75 g/Kg de glicose (máx. 75 g).

Obs: Um resultado positivo em qualquer dos testes acima deverá ser confirmado nos dias subsequentes medindo a glicemia em jejum ou 2 h após o TTOG.

2.3 Uso de plantas no tratamento do diabetes

O uso de plantas é o tratamento mais antigo para Diabetes Mellitus e data do "Papiro de Ebers" de 1550 a. C, o qual recomendava dieta com grande quantidade de fibras e grãos de algodão e ocre. Antes do advento da insulina exógena e dos hipoglicemiantes orais, o uso de produtos naturais era a principal forma de controle da diabetes (GRAY; FLATT, 1999).

Intervenções medicamentosas mostram efeitos positivos, porém os efeitos colaterais de diversas drogas têm despertado o interesse dos efeitos de compostos vegetais na redução das concentrações sanguíneas de glicose, visto que muitos indivíduos escolhem a suplementação dietética e terapias alternativas com ervas como preferencial, o que resulta em maior aderência ao tratamento (RATES, 2001).

Estudos sobre novas drogas hipoglicemiantes vêm sendo realizados, com enfoque especial em dados etnobotânicos, como etapa na prospecção de novos produtos e de forma mais direcionada do que nos estudos ao acaso (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; BARBOSA-FILHO et al, 2006). Um exemplo é o uso de *Galega officinalis*, que levou ao desenvolvimento da metformina, droga hipoglicemiante oral amplamente utilizada (NOEL et al, 1997).

Em dezembro de 2008, foi instituído o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, visando inserir, com segurança, eficácia e qualidade, plantas, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). O programa busca promover e reconhecer práticas populares e tradicionais quanto ao uso de plantas como medicinais. Em janeiro de 2009, foi publicado a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Nessa lista, constam 71 espécies vegetais que podem ser usadas como medicamentos fitoterápicos hipoglicemiantes no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2009). Nesse contexto, estudos etnobotânicos podem contribuir na prospecção de novos produtos à medida que listam plantas medicinais já conhecidas e utilizadas em determinada região, com potencial para serem inseridas nos sistemas públicos de saúde.

Os princípios ativos de vegetais estudados como benéficos no controle da diabetes, atestam a ação sobre o aumento de insulina, modificação no metabolismo da glicose, inibição de fatores hiperglicemiantes, inibição ou estímulo da síntese de enzimas ou ainda nas complicações decorrentes da diabetes. Destacam-se como compostos antidiabéticos: polissacarídeos, proteínas, esteroides, terpenóides, alcaloides, flavonoides, glicosídeos,

triterpenos, óleos, vitaminas, saponinas, peptídeos e aminoácidos (ABDEL-HASSAN et al, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as principais alterações imunológicas e bioquímicas na saliva de pediátricos com neoplasia e de pacientes diabéticos, bem como realizar um levantamento das plantas utilizadas como medicinais para tratamento de Diabetes Mellitus em serviços públicos de São Luís, MA .

3.2 Específicos

CAPITULO I

- Mensurar a concentração salivar de anticorpos IgA total e anti-mutans e IgA anti-insulina;
- Determinar a concentração salivar de glicose, cálcio, ureia, proteínas totais e amilase;
- Avaliar o Índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D) dos pacientes diabéticos;
- Correlacionar os dados salivares entre si e com os dados odontológicos.

CAPITULO II

- Identificar junto aos pacientes diabéticos quais as plantas mais utilizadas como hipoglicemiantes;

- Caracterizando o uso dessas plantas pela população local;
- Relacionar as principais espécies citadas quanto a ação.

CAPITULO III

- Investigar a eficácia da saliva no monitoramento de pacientes pediátricos portadores de neoplasias;
- Mensurar a concentração salivar de anticorpos IgA total ;
- Determinar a concentração salivar de glicose, cálcio, ureia, proteínas totais e amilase;
- investigar a concentração salivar de insulina e hormônios tireoidianos;

4. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO I

Artigo submetido ao Journal of Oral Pathology and Medicine.

Fator de Impacto: 1.628

Biochemical and Immunological Salivary Profile in Diabetic Patients

M.V.V. Lima, R.N.M. Guerra.

Laboratory of Immunophysiology,

Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

Support: FAPEMA/CNPq/PPSUS and UFMA

Address for correspondence:

Rosane Nassar Meireles Guerra

Laboratory of Immunophysiology - Campus Universitário do Bacanga, Centro

São Luís, MA, Brasil

Tel: 55-98-3301-8548

E-mail: rnmguerra@pq.cnpq.br

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the biochemical and immunological characteristics of saliva from diabetic patients in comparison to non-diabetic adults. Eighty-eight diabetic adults and thirty-nine non-diabetic adults (control) were included in the study. Glucose, urea, calcium, total protein and amylase were determined by a colorimetric method and total IgA and IgA anti-*Streptococcus mutans* and anti-insulin were measured by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The caries status was evaluated using the DMFT index. Glucose, urea, calcium, anti-*S. mutans* IgA, total IgA and anti-insulin IgA were significantly higher in diabetic patients, whereas total protein and amylase levels were lower in those patients. No positive correlation was observed between blood glycemia and salivary glucose levels in every group. Diabetic patients had higher DMFT index. The present study showed significant differences in the salivary composition of diabetic patients, indicating a strong association between these findings and the systemic health status. The results suggest the use of saliva as diagnostic fluid and to follow up patients with diabetes mellitus.

Keywords: Saliva, Composition, Diabetes Mellitus, IgA, Glucose, urea, calcium

Introduction

Diabetes mellitus is a public health problem since, in addition to important social repercussion, it is a chronic disease that affects a growing number of individuals from various countries that are at different stages of economic and social development [1]. The classification of diabetes includes four clinical classes: Type 1 diabetes (results from β cell destruction, usually leading to absolute insulin deficiency), type 2 diabetes (results from a progressive insulin secretory defect on the background of insulin resistance), other specific types of diabetes due to other causes and gestational diabetes mellitus [2].

Systemic diseases such as diabetes compromise salivary gland function and, consequently, the production of saliva, influencing the quantity and quality of saliva produced. Alterations in the chemical components and physical properties of saliva can serve as diagnostic parameters and saliva testing may therefore be added to the arsenal of complementary tests [3]. Saliva presents several advantages over serum, including its simple and noninvasive collection and ease storage, transport and handling [4]. The wide variety of components found in saliva makes available its use for diagnosis, prognosis and monitoring of human diseases [5] for example, hereditary or congenital diseases [6], autoimmune diseases, cardiovascular diseases, infectious [7] cancer [8], diabetes [9] caries [10] and periodontal disease [11], among others.

The alterations in the saliva production and composition between diabetic and non-diabetic patients have been found but the results are still contradictory. Our aim was to evaluate the biochemical and immunological profile in the saliva of diabetic patients.

Materials and Methods

Population

The sample size was calculated based on the prevalence of diabetes in Maranhão (MS - Hiperdia, 2011) [12], with a confidence interval of 95%. Data were collected systematically from August 2008 to September 2009. The Sample consisted of 142 patients (93 diabetics and 49 control).

This study used a convenience sample based on the following parameters for inclusion: aged from 18 years; previous diagnosis of diabetes mellitus; participation on the Diabetes Program of Presidente Dutra University Hospital, São Luís, Maranhão, Brazil. Only 88 diabetic patients, who met the inclusion criteria, presented sufficient salivary flow for analysis and effectively agree to participate in the study. For inclusion within the control group were met the following requirements: aged from 18 years, no systemic disease or diabetes, no history of medication use. Only 39 non-diabetic patients, who met the inclusion criteria, effectively participated in the study. Socio-demographic data were obtained following a semi structured interview.

All subjects received information regarding the objective and procedures of the study and only participated in the data collection after signing a free informed consent form. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Maranhão (Protocol N° 33104-149/2005).

Collection of saliva samples

Unstimulated whole saliva was collected from fast diabetic and non-diabetic patients over a period of 5 min. After rinsing their mouth with filtered water, the patients were asked to spit saliva into a sterile flask. The Flasks were sealed immediately after sample collection and refrigerated at 4°C before transport to the laboratory. Saliva

samples were centrifuged (10,000 rpm, 10 min) to reduce the salivary debris and viscosity. The glucose and total protein concentration was determined immediately after centrifugation. The other parameters were evaluated later in a supernatant stored at -20°C.

Biochemical analysis

The glucose, total protein, urea, calcium and amylase concentration were determined by a colorimetric method. The analysis were performed by means of automated procedures on an Architect - C8000 apparatus (Abbott®) for glucose, amylase, total protein and calcium. Individual samples were tested in triplicate.

Determination of IgA levels

Salivary Total IgA, anti-*Streptococcus mutans* IgA and anti-insulin IgA antibodies were determined by an enzyme immunoassay (ELISA) as previously described [11]. Briefly, anti-human IgA (Sigma, Saint Louis, USA) was diluted to a concentration of 50 µg/mL in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and adsorbed onto wells of flat-bottomed ELISA strips (NUNC, Roskilde, Denmark) with overnight incubation at 4 °C. The wells were then washed five times with 0.15 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) containing 0.05% Tween 20 (Promega, Madison, USA; PBS-T) and incubated in PBS containing 1% bovine serum albumin (Sigma; PBS-TA) for 1 h at 37 °C. Wells were washed five times, followed by the addition of 100 µL of 10-fold dilutions (1:100 to 1:1000) of saliva samples in PBS. After 30 min at 37 °C and further washing, 100 µL alkaline phosphatase-labeled goat anti-human IgA (Sigma; diluted 1:1000 in PBS-T) was added to the wells and incubated for 2 h at 37 °C. The strips were then washed five times with PBS-T, and the color was developed by adding 100 µL of a solution of p-nitrophenylphosphate (Sigma;

pNPP) to the strips and incubating them in the dark for 30 min. The reaction was stopped with 1 N NaOH (Sigma), and the optical density was measured at a wavelength of 405 nm.

Clinical examination

The patient caries status was evaluated using the DMFT (decayed, missing and filled permanent teeth) index. This clinical examination was done by a single examiner. Data on oral hygiene, access to dental care and salivary flow were also collected.

Statistical analysis

Quantitative variables the two groups were compared by the Student *t*-test. The correlation between diabetic and non-diabetic patients was evaluated using Pearson's linear correlation coefficient. For the diagnostic test it was employed the ROC curve. This evaluation considered the values from glucose, total protein, urea, anti-insulin IgA and amylase concentration. The test was defined as positive when alterations were observed in at least four parameters. The sensitivity of the test was 88%, specificity was 90%, and diagnostic accuracy was 89%. Categorical variables were estimated by the Fisher's exact test.

The level of significance for rejection of the null hypothesis was set at $p \leq 0.05$ in all tests. All analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 program.

Results

The control group consisted of 39 clinically healthy subjects with a mean \pm SD, age of 23 ± 6 years (range: 19-50 years) and the mean \pm SD age of the diabetic patients was 52 ± 18 years (range: 18-84 years).

Among the 88 diabetic patients studied, 57 were females and 31 were males, and

59 were using insulin. The time since the diagnosis of diabetes was 11.12 ± 7.95 years. And the values of blood glucose was 260.67 ± 131.09 mg/dL. The data obtained for diabetic patients were compared to those obtained for a control (non-diabetic) group of 39 subjects, including 22 females and 17 males. Mean \pm SD blood glucose levels were 92.17 ± 9.11 mg/dl in this group.

Table 1 shows the salivary biochemical parameters and Figure 1 illustrates the immunological parameters. Glucose, urea, calcium, anti-*S. mutans* IgA, total IgA and anti-insulin IgA were significantly higher in diabetic patients ($p < 0.05$). On the other hand, total protein and amylase concentrations were significantly lower in diabetic patients ($p < 0.05$).

No positive correlation was observed between glycemia and salivary glucose levels in either group, although the glucose level in diabetes was higher than in control group (Table 1). A negative correlation occurs between the salivary concentration of glucose and anti-insulin IgA.

The diabetic patients were divided into two subgroups according to the use or not of insulin. The results showed no statistical differences among diabetes I or diabetes II patients, for this reason salivary data was evaluated altogether as diabetic patients (Table 2).

A ROC curve was constructed to validate the salivary parameters that might be used for diagnostic testing. Glucose, total protein, urea, anti-insulin IgA, amylase and calcium concentration were included in the analysis. Only calcium was excluded after ROC analysis since it presented an area of 0.5, therefore, it was not statistically significant (Table 3).

The clinical examination showed a high DMFT (decayed, missing, filled permanent teeth) index in diabetic patients (Table 4). In addition, these patients had lower oral hygiene, less access to dental care and xerostomy signs like dry mouth when

compared with the control group (Table 5).

Discussion

Whole saliva is a mixture of salivary gland secretions containing substances derived from gingival crevicular fluid, desquamated epithelial cells, food rests, microorganisms, and products derived from microbial metabolism [13]. Since stimulation affects both the production of saliva and the concentration of some of its components [3, 14], in the present study unstimulated whole saliva was used to evaluate oral alterations associated with diabetes in adult patients.

Diabetic patients presented a significant increase in the salivary concentration of glucose, calcium and urea. Similar results regarding calcium concentration have been previously reported [15]. In addition, the increased were similar to those reported by other investigators that evaluated biochemical parameters in the saliva of diabetic patients [16]. Alterations in salivary composition have been suggested to affect the development, symptoms and severity of many oral diseases mainly in diabetic patients [9].

Diabetic patients showed higher glucose concentration in the saliva despite no correlation between salivary and blood glucose levels. Saliva and blood levels of glucose may be considered independent variable as previously described for adults [16, 17, 18] and children with diabetes [19]. According to Jurysta *et al* [17], salivary glucose concentration is always higher in diabetic patients than in control subjects in both unstimulated and stimulated saliva, and this high concentration exerts potentially unfavorable effects on the oral health of these patients. These results are similar to our finds and confirm the weak link between glycemia and glucose concentration or excretion in saliva, at least in individual cases [18].

The total amylase and the protein was significantly lower in diabetic patients, the

amylase level was evaluate as a marker for metabolic and hormonal changes on salivary glands products. The lower level of amylase was also described in diabetic patients by Yavuzylmaz *et al* [20]. In contrast the results regarding the total protein concentration in saliva were different from those evaluating this parameter after freezing and storage of the sample [21]. Probably because in our study the assay was performed immediately after collection and centrifugation of the saliva in order to prevent the endogenous proteolytic activity [4].

Evaluation of immunological changes in saliva showed a higher total IgA antibody concentration in diabetic patients. These findings are probably associated with the elevated levels of specific anti-*S.mutans* and anti-insulin antibody levels also observed in those patients. Determination of possible alterations in whole saliva composition may be use for diagnosing possible variations and defective host immune responses, including the secretion of s-IgA [22] Similar results have been reported previously in other studies evaluating the salivary production of IgA antibodies in diabetic patients [20,23].

According to Batista *et al* [23], *S. mutans* counts are usually higher in diabetic patients. Although the degree of infection of the patients was not quantified in this study, elevated anti-*S. mutans* antibodies might be related to an increased bioavailability of bacterial antigens. The local response of specific antibodies to certain plaque bacteria such as *S. mutans* may identify sites with a potential risk of developing caries and other oral diseases even before onset of the first clinical signs [24]. *Streptococcus mutans* is a Gram-positive bacterium that is potentially aggressive to various tissues. Elevated anti-*S. mutans* IgA concentrations may indicate that the patients are systematically exposed to this microorganisms, as well as a higher risk of caries [25].

The same may apply to the increased concentration of anti-insulin antibodies. However, in this case the higher concentration of self-reactive antibodies to insulin

demonstrates, although indirectly, an increase in self-reactive clones, an event that effectively contributes to increase the range of changes observed in diabetes. The detection of anti-insulin antibodies is important in such a way that these molecules can be used as diagnostic and prognostic markers not only of diabetes but also of other autoimmune diseases [26,27]. It seems reasonable to propose that salivary antibodies can be used to monitor diabetic patients with the same accuracy as that observed for serum anti-insulin antibodies and with less discomfort to the patient during fluid collection.

Since a large number of patients were using injectable insulin, we investigated whether this treatment may alter the variables analyzed. No significant differences in salivary biochemical or immunological parameters were observed between non-insulin-dependent and insulin-dependent diabetic patients. Similar findings have been reported by Jurysta *et al* [17] and Yavuzylmaz *et al* [20] who compared saliva of insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetic patients.

Biochemical and immunological alterations in the saliva of diabetic patients have already been described and the salivary changes may serve as a complementary parameter for the diagnosis of diabetes mellitus [3]. In the present study, the clinical performance of an individual test was demonstrated by the ROC curve (receiver operating characteristic). After that the variables were combined and analyzed for validation for diagnostic use. The greater the capacity of a test to discriminate between diabetic and non-diabetic subjects, the closer is the curve to the left corner of the graph, with an area under the curve close to 1 [28]. The sequence of individual variables that best discriminated diabetic patients was glucose (area of 0.99), total protein (area of 0.98), amylase (area of 0.95), anti-insulin IgA (area of 0.83), and urea (area of 0.80). The accuracy of the diagnostic test combining these parameters was 89%. A similar accuracy (90%) was reported by Lopez *et al* [19] who used saliva for the diagnosis of

diabetes in children considering calcium, urea, total sugars, glucose and total protein concentration as done in the present study for adult patients.

The association of dental caries with diabetes is less clear. In this study, diabetic patients had a DMFT index greater than the control group. The average number of teeth lost was 16 and 3.7 decayed teeth being responsible for the high DMFT index of these patients. The dry mouth feeling and increased glucose in the saliva as reported here could alter the effectiveness of protective saliva in relation to caries [10]. Other factors such as deficiency oral hygiene instruction and regular care of these patients may aggravate pre-existing disease. Its important to emphasizes the age differences between the control group (23 ± 6 - range: 19-50 years) and diabetic patients (52 ± 18), as well the range intra group (range: 18-84 years), due to the inclusion criteria.

Diabetic patients with reduced salivary flow show an increased risk for enamel hypomineralization and caries formation [29]. When salivary flow decreases, many oral alterations as increased concentration of mucin and glucose. Proliferation of pathogenic microorganisms may occur. Some other alterations occur in a consequence of chronic hyperglycemia as: tongue alterations, periodontal disease, demineralization of the teeth and greater infection risk [30]. Early detection and treatment of hyperglycemia and hyposalivation may provide a useful strategy for preventing the dental complications of diabetes and promoting oral health in this population [31].

Salivary composition that correlated with the existence of oral pathology in diabetes type 1 and 2, finding decay in 100% of cases and increased periodontal disease [32, 33]. CARDA *et al* [16] evaluating type 2 diabetic patients, found that all patients had symptoms of periodontal disease, associated with tooth decay and tooth loss. Jones *et al* [34] showed that the caries risk was increased in 457 patients with diabetes mellitus. Their study included patients with diabetes type 1 and type 2, similar to what

occurred in this work.

There was a positive correlation between DMFT and total IgA and a negative correlation between DMFT and brushing in diabetic patients. Similar results were described by Smith; Taubman [35], evaluating adult human patients. In the group with caries there was a positive correlation, statistically significant, between the plaque index and specific IgA.

The diagnostic value of saliva has been demonstrated in a series of studies showing the accuracy and specificity of this body fluid for the diagnosis of diseases [3, 4, 5, 7, 8, 9, 14, 16, 17, 19, 20, 36]. The ease of collection of saliva samples and the lower risk of contamination of healthcare workers during sample handling are important advantages supporting the use of this fluid as a diagnostic tool. In addition, studies comparing the results of saliva analysis with other reliable scientific methods such as blood measurements have demonstrated that the method is reliable and, therefore, its application is valid.

The present study was the first to demonstrate that the association between several parameters may be used to follow up diabetic patients since significant differences in the saliva composition of diabetic patients, indicating a strong relationship between these findings and the systemic health status of the patient. In addition, some salivary parameters were found to be useful to classify an adult as diabetic. Therefore, this difference in salivary composition suggests the use of saliva as an alternative fluid to monitoring of patients with diabetes mellitus.

References

- [1] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H .Global prevalence of diabetics: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 2004; 27:1047-1053.
- [2] American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care** 2012; 35 (Suppl 1): S11-S63.
- [3] Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PH, Oliveira filho SA. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão da literatura. **Pesq Bras Odontop Clin Integr** 2007; 7: 187-194.
- [4] Bigler LR, Streckfus CF, Dubinsky WP. Salivary Biomarkers for detection of malignant tumors that are remote from oral cavity. **Clin Lab Med** 2009; 29:71-85.
- [5] Oliveira Júnior JJ, Guerra RNM. Biomarcadores imunológicos da saliva. **Rev Ciênc Saúde** (São Luís) 2010; 12: 136-145.
- [6] Grody WW. Cystic fibrosis: molecular diagnosis, population screening, and public policy. **Arch Pathol Lab Med** 1999; 123:1041-1046.
- [7] Pink R, Simek J, Vondrakova J, Faber E, Michl P, Pazdera J, et al. Saliva as a diagnostic medium. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** 2009; 153:103-110.
- [8] Guerra RNM, Oliveira-Junior JJ, Mouchrek-Filho JCE, Liberio AS, Lima MVV, Paim DBS, Brito CXL, Mendonça C, Nascimento FRF, Pereira ALA. Salivary evaluation of pediatric patients with cancer, before and after antineoplastic treatment. **J Oral Pathol Med**. 2012; 41: 527-553.
- [9] Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. **Diabetology & Metabolic Syndrome** 2010; 2:3.
- [10] Miko S, Smbrus SJ, Sahafian S, et al. Dental caries and adolescents with type 1 diabetes. **Br Dent J** 2010; 208:1-4.

- [11] Branco-de-Almeida LS, Alves CMC, Lopes FF, Pereira AFV, Guerra RNM Pereira ALA. Salivary IgA and periodontal treatment needs in diabetic patients. **Braz Oral Res.** 2011; 25: 550-555.
- [12] MS - Ministério da Saúde do Brasil - HIPERDIA - captured on August 2011 - site: <http://hiperdia.datasus.gov.br/>
- [13] Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic application of saliva. A review. **Crit Rev Oral Biol** 2002; 13: 197 - 212.
- [14] Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. **J Oral Pathol Med** 1990; 19:119 - 125.
- [15] Monteiro AMD, Araújo RPC, Gomes Filho IS. Diabetes Mellitus tipo 2 e Doença Periodontal. **RGO** 2002, 50: 50-54.
- [16] Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gomez De Ferraris ME, Peydró A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2006; 11: 309-314.
- [17] Jurysta C, Bulur N, Oguzhan B, Satman I, Yilmaz TM, Malaisse WJ, Sener A. Salivary glucose concentration and excretion in normal and diabetic subjects. **J Biomed and Biotechnol** 2009; 6p.
- [18] Soares MSM, Batista-Filho MMV, Pimentel MJ, Passos IA, Küstner EC. Determination of salivary glucose in healthy adults. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2009; 14: 510-513.
- [19] Lopez ME, Colloca ME, Páez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A. Salivary characteristics of diabetic children. **Braz Dent J** 2003; 14: 26-31.
- [20] Yavuzyilmaz E, Yumar O, Akdoganli T, Yamalik N, Ozer N, Ersoy F, Yeniyi. The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. **Aust Dent J** 1996; 41: 193-7.
- [21] Flegal KM, Ezzati TM, Harris MI, Haynes SA, Juarez RZ, Knowler WC. Prevalence of diabetes in Mexican Americans, Cubans, and Puerto Ricans from the

- Hispanic Health and Nutrition Survey, 1982-1984. **Diabetes Care** 1991;14:628-38.
- [22] Bachrach G, Muster Z, Raz I, Chaushu G, Stabholz A, Nussbaum G, et al. Assessing the levels of immunoglobulins in the saliva of diabetic individuals with periodontitis using checkerboard immunodetection. **Oral Dis.** 2008;14: 51-59.
- [23] Batista JE, Batista CEM, Monteiro Neto V, Guerra RNM. Colonização por *Streptococcus mutans* e dosagens de anticorpos antiinsulina na saliva de diabéticos. **Rev Ciênc Saúde (São Luís)** 2004; 6:11-20.
- [24] Bratthall D, et al. Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of mutans streptococci. **Oral Microbiology Immunol** 1997; 12: 212 - 218.
- [25] Koga-Ito CY, Martins CAP, Balducci I, Jorge AOC. Correlation among mutans streptococci counts, dental caries, and IgA to *Streptococcus mutans* in saliva. **Braz Oral Res** 2004; 18: 350-355.
- [26] Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS. Early expression of anti-insulin auto-antibodies of humans and the NOD mouse: evidence early determination of subsequent diabetes. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97: 1701 - 1706.
- [27] Kamradt T, Mitchison NA. Advances in Immunology: Tolerance and Autoimmunity. **New Engl J Med** 2001; 344: 655 - 664.
- [28] Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva de ROC para testes diagnósticos. **Cadernos de Saúde Coletiva** 2003; 11:7-31.
- [29] Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, et al. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001;92: 281-291.
- [30] Vernillo AT: Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. **J Am Dent Assoc** 2003, 134: 24S-33S.

- [31] Yeh CK, Harris SE, Mohan S, Horn D, Fajardo M, Chun YHP, Jorgensen J, MacDougall M, Abboud-Wener S. Hyperglycemia and xerostomia are key determinants of tooth decay in type 1 diabetic mice. **Laboratory Investigation** 2012; 92: 868-882.
- [32] Ben-Aryeh H, Serouya R, Kanter Y, Szargel R, Laufer D. Oral health and salivary composition in diabetic patients. **J Diabetes Complications** 1993; 7: 57-62.
- [33] Arrieta J, Bartolomé B, Jiménez E, Saavedra P, Arrieta F. Problemas bucodentales en pacientes con diabetes mellitus. **Med Oral** 2003; 8: 97-109.
- [34] Jones RB, McCallum RM, Kay EJ, Kirkin V, McDonald E. Oral health and oral health behaviour in a population of diabetic clinic attenders. **Community Dent Oral Epidemiol** 1992; 20: 204-207.
- [35] Smith D J, Taubman M A. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. **Crit Rev Oral Biol Med.** 1992; 3: 109-133.
- [36] Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnostic of disease and monitoring of general health. **J Can Dent Assoc** 2002; 68: 170-174.

Table 1: Salivary parameters of diabetic and non-diabetic patients.

Parameter	Control ^a	Diabetic ^a	P value
Glucose (mg/dL)	3 ± 0.03 ^b	11 ± 2	0.01
Urea (mg/dL)	17 ± 1	27 ± 1	0.0001
Calcium (mg/dL)	2 ± 0.1	2 ± 0.1	0.0004
Total protein (mg/dL)	2 ± 0.1	0.3 ± 0.03	0.0001
Amylase (AU/dL)	37 ± 0.4	37 ± 0.1	0.008

a: Saliva samples obtained from 39 non-diabetic (control) subjects and 88 diabetic patients of both genders were evaluated.

b: Results are reported as the mean ± standard deviation ($\bar{X} \pm SD$)

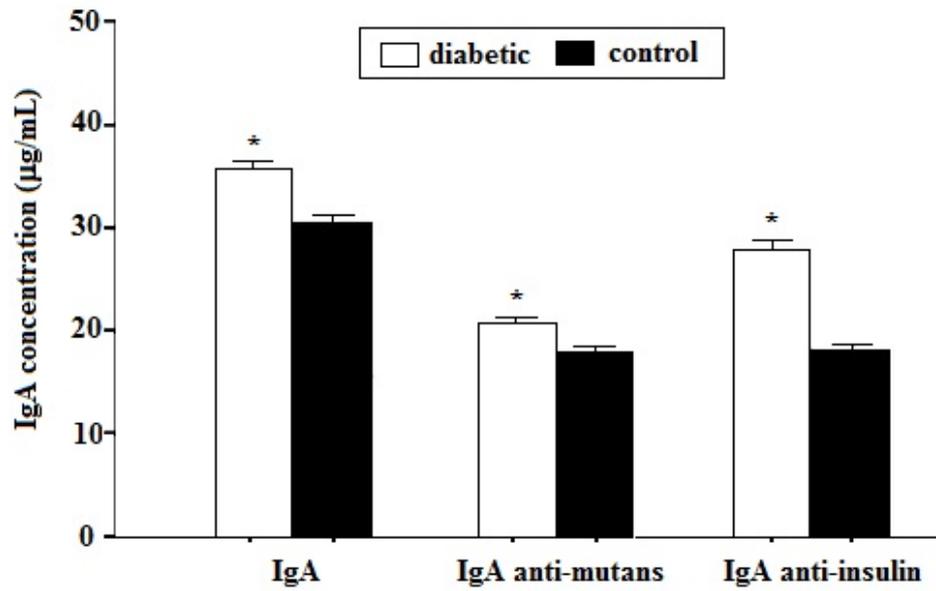


Figure 1: Salivary concentration of total IgA, anti-*Streptococcus mutans* IgA and anti-insulin IgA in diabetic patients and healthy controls. The results are mean \pm standard deviation ($\bar{X} \pm SD$) of 88 diabetic patients (D) and 39 controls (C). (*) Significant when $p < 0.05$ in comparison with the control group.

Table 2: Composition of the saliva of diabetic patients using and not using insulin.

Parameter	Use of insulin		P valor
	YES	NO	
Glucose	12 ± 3 ^b	9 ± 3 ^b	0.51
Urea	28 ± 1	25 ± 1	0.06
Calcium	2 ± 0.1	2 ± 0.2	0.41
Amylase	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.56
Total protein	37 ± 1	37 ± 1	0.57
anti-mutans IgA	21 ± 1	20 ± 2	0.59
Total IgA	35 ± 1	36 ± 1	0.61
anti-insulin IgA	28 ± 2	27 ± 2	0.51

a: Saliva samples obtained from 88 diabetic patients of both genders were evaluated.

b: Results are reported as the mean ± standard deviation ($X \pm SD$)

Table 3: Area under the ROC curve obtained for salivary parameters of diabetic patients.

Parameter ^a	Area under the ROC curve	Standard error	P value
Glucose	0.99	0.01	<0.0001
Total protein	0.98	0.02	<0.0001
Amylase	0.95	0.02	<0.0001
Anti -Insulin IgA	0.84	0.04	<0.0001
Urea	0.81	0.05	<0.0001
Calcium	0.55	0.06	0.4274

a: Saliva samples obtained 88 diabetic patients of both genders were evaluated.

Table 4: Index of decayed, missing, filled permanent teeth - DMFT in diabetic patients.

Index	Diabetics (n=88)	Control (n=39)	P Valor
D	4 ± 0.4 ^a	1±0.2	P<0.001
M	16 ± 1	0.5 ± 0.2	P<0.001
F	1 ± 0.2	3 ± 0.4	P<0.001
DMFT ^b	20±1	5±0.5	P<0.001

a: Results are reported as the mean ± standard error of the mean.

b:DMFT : decayed, missing, filled permanent teeth

Table 5: Data from the oral hygiene, access to dental care and feeling a dry mouth of diabetics and control patients.

	Diabetics <i>f</i> (%) ^a	Control <i>f</i> (%) ^a	<i>P</i> value ^b
Number of tooth brushing			
1-2	52	10	P<0.0001
3-4	48	90	
Total	100	100	
Use of dental floss			
Yes	22	67	P<0.0001
No	78	33	
Total	100	100	
Last dental visit			
1 year	23	61	P<0.0001
2-3 years	77	38	
Total	100	100	
Feeling a dry mouth			
Yes	63	5	P<0.0001
No	37	95	
Total	100	100	

^a*f* (%), frequency expressed as percentage

^bFisher's exact test

4.2 CAPÍTULO II

Espécies vegetais utilizadas por pacientes diabéticos como hipoglicemiantes
em São Luís, Brasil.

LIMA, M.V.V ; GUERRA, R.N.M

Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

Support: FAPEMA/CNPq/PPSUS and UFMA

Address for correspondence:

Rosane Nassar Meireles Guerra

Laboratory of Immunophysiology - Campus Universitário do Bacanga, Centro

São Luís, MA, Brasil

Tel: 55-98-3301-8548

E-mail: rnmguerra@pq.cnpq.br

Resumo

Muitas espécies vegetais são utilizadas pela população no tratamento da diabetes mellitus. Assim o objetivo desse estudo foi realizar o levantamento etnofarmacológico das plantas mais utilizadas para tratamento de diabetes mellitus no município de São Luís - MA. Foram entrevistados 107 pacientes diabéticos, dos quais 49 relataram o uso de espécies vegetais como tratamento complementar ou alternativo. As 16 espécies vegetais para tratamento do diabetes foram: *Anacardium occidentale*, *Arrabidaea chica*, *Artocarpus altilis (incisa)*, *Bauhinia fortificata*, *Cecropia adenopus*, *Cissus sicyoides*, *Citrus limon*, *Cucumis anguria*, *Mangifera indica*, *Maytenus ilicifolia*, *Phyllanthus niruri*, *Quassia amara*, *Solanum melongela*, *Syzygium cumini*, *Tamarindus indica* e *Turnera guynensis*. Sendo que pata de vaca (*Bauhinia fortificata*), azeitona doce (*Syzygium cumini*), insulina (*Cissus sicyoides*) e tamarindo (*Tamarindus indica*) foram as mais utilizadas. Os resultados mostram que o tratamento com plantas foi majoritariamente utilizado em associação à terapia convencional com hipoglicemiantes e/ou insulina. Concluímos que entre os diabéticos que utilizam plantas no tratamento da diabetes, grande parte usa as folhas na forma de chá, sendo que a maioria utiliza pata de vaca, azeitona doce e insulina como complemento para controle glicêmico e para reduzir os demais efeitos associados a diabetes.

Palavras-chave: Diabetes, plantas, fitoterápicos, etnofarmacologia.

Introdução

Nas últimas décadas tem se observado um rápido aumento na incidência diabetes mellitus em todo o mundo. No Brasil o percentual de diabéticos subiu principalmente entre os homens, passando de 4,4% em 2006 para 5,2% no ano passado. Esse levantamento foi feito em 26 capitais e no Distrito Federal e mostra que a frequência do diagnóstico médico prévio de diabetes foi de 5,6%, sendo de 5,2% entre homens e de 6,0% entre mulheres. Em São Luís a frequência de adultos que referiram diagnóstico médico prévio de diabetes foi de 5,7% em homens e 3,8% em mulheres (BRASIL, 2012).

Para conviver bem com a doença há necessidade do rigoroso controle glicêmico, uma vez que ainda não existe cura. Intervenções medicamentosas mostram efeitos positivos, porém o custo elevado, a baixa aderência ao tratamento e os efeitos colaterais de diversas drogas têm despertado o interesse em extratos vegetais capazes de reduzir a glicose sanguínea, visto que muitos indivíduos escolhem a suplementação dietética e terapias alternativas com ervas medicinais como tratamento de eleição (RATES 2001).

Muitas espécies vegetais têm sido usadas como medicamento para o tratamento da diabetes mellitus e suas complicações (LI et al, 2004). A maioria dos vegetais utilizados como antidiabéticos apresentam atividade hipoglicemiante e possuem constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes. Entretanto, o efeito hipoglicemiante pode ser decorrente de toxicidade ou de mecanismos que não são terapeuticamente úteis no diabetes. Na verdade os efeitos tóxicos que resultam em hipoglicemia podem também estar relacionados à hepatotoxicidade e ao bloqueio de receptores β -adrenérgicos (MARLES,

FARNSWORTH, 1995; SAID et al, 2002, HUO et al, 2003).

Estudos sobre novas drogas hipoglicemiantes vêm sendo realizados, com enfoque especial no uso etnofarmacológico, pois é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas com uso popular consagrado do que em plantas escolhidas ao acaso (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; BARBOSA-FILHO et al, 2005). Um exemplo é a espécie *Galega officinalis*, que levou ao desenvolvimento da Metformina, droga com ação hipoglicemiante oral (NOEL et al, 1997).

A maioria dos medicamentos disponíveis no mercado são derivados direta ou indiretamente de plantas. Dados etnobotânicos indicam que cerca de 1200 plantas no mundo apresentam potencial antidiabético (ALARCON-AGUILARA et al 2002; KAHN et al, 2012), muitas vezes devido a ação que exercem sobre o controle da glicemia. Dentre os compostos ativos com ação anti-diabetes se destacam os polissacarídeos, proteínas, esteroides, terpenóides, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, triterpenos, óleos, vitaminas, saponinas, peptídeos e aminoácidos (ABDEL-HASSAN et al, 2000).

Como o uso de plantas ainda não é um tratamento completamente comprovado para o caso de diabetes e considerando o uso indiscriminado pela população como forma de controlar essa doença, o presente trabalho investigou as espécies vegetais utilizadas para tratamento de Diabetes Mellitus entre pacientes atendidos pelo Programa de Diabéticos no Hospital Universitário, da cidade de São Luís - MA.

Material e Métodos

O desenho experimental seguiu o modelo de estudo transversal, com dados coletados, sistematicamente, entre julho de 2008 e setembro de 2009. O

cálculo do tamanho da amostra foi baseado na prevalência de diabetes no Maranhão e no Brasil conforme o programa HIPERDIA, com margem de erro de 5% e nível de confiança de 95%.

A população estudada foi composta de 107 pacientes diabéticos tipo 1 e 2. Neste estudo foi utilizada uma amostra de conveniência, tendo em vista o local de obtenção dos dados. Foram considerados como critério de inclusão os pacientes com idade a partir de 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico comprovado de diabetes mellitus, desde que atendidos pelo Programa de Diabéticos no Hospital Universitário Presidente Dutra, em São Luís - MA.

Os dados foram obtidos a partir de entrevista semi-estruturada, utilizando questionário padrão, composto por questões abertas e fechadas, que avaliaram os seguintes tópicos: perfil socioeconômico, uso de plantas como medicinais, uso de medicamentos e de insulina, dados sobre a saúde geral do entrevistado. Todos os indivíduos receberam informações sobre os objetivos e procedimentos da investigação, antes da adesão à pesquisa. Os pacientes só participaram da coleta de dados após terem assinado um termo de consentimento livre esclarecido. O Protocolo adotado foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Presidente Dutra, São Luís, MA (Protocolo Nº 33104-149/2005).

A análise descritiva dos dados foi feita a partir da determinação das frequências absolutas e relativas usando o software SPSS 16.0 para Windows (2007).

Resultados

A idade dos pacientes foi de 53 ± 17 anos (média \pm DP). Destes 37% eram do sexo masculino e 63% do sexo feminino. O tempo da doença foi

estimado em 10 ± 7 anos (média \pm DP). Do total de pacientes entrevistados 76% relataram antecedentes familiares para diabetes. A maioria dos pacientes (67%) apresentou outra patologia além do diabetes, sendo as mais comuns: hipertensão arterial (56%). Outras patologias encontradas foram: hipercolesterolemia, doenças cardíacas, renais, e outras. Apenas 31% dos diabéticos praticavam atividade física.

Em relação ao uso de medicamentos, apenas 5% dos pacientes não o faziam e controlavam a doença somente com dieta. A análise mostrou que 46% dos pacientes utilizavam plantas como coadjuvante ao tratamento farmacológico e ainda que o tratamento com plantas sempre elevou o valor médio glicemia sanguínea e resultou em maior heterogeneidade dos resultados, e por isso nem sempre as diferenças com o grupo similar foram estatisticamente diferentes (Tabela 1).

Tabela 1: Uso de Medicamentos e Plantas Medicinais para tratamento de Diabetes em São Luís, MA, Brasil.

Tratamento	Glicemia Sanguínea (mg/dL)	Nº de pacientes	f (%)
Insulina	242 ± 11	31	29
Insulina + Planta Medicinal	$297 \pm 106^*$	18	17
Insulina + Hipoglicemiante Oral	206 ± 74	7	6
Insulina + Hipoglicemiante Oral + Planta Medicinal	$333 \pm 166^*$	12	11
Hipoglicemiante Oral	164 ± 92	15	14
Hipoglicemiante Oral + Plantas Medicinais	$212 \pm 66^*$	19	18
Dieta	264 ± 115	5	5
	Totais	107	100

Os pacientes relataram o uso de 16 espécies vegetais para tratamento da diabetes, sendo que 7 pacientes faziam o uso de mais de uma espécie. A forma de preparo mais utilizada foi o chá e a parte da planta mais empregada foi a folha (Tabela 2).

Tabela 2: Uso etnofarmacológico de espécies vegetais para tratamento de diabetes mellitus em São Luís - MA, Brasil.

Espécie vegetal		Parte vegetal utilizada	Forma de preparo	Pacientes	
Nome Científico	Nome Popular citado			Nº	f
<i>Anacardium occidentale</i>	Caju	Folha	Chá	2	4
<i>Arrabidaea chica</i>	Pariri	Folha	Chá	4	8
<i>Artocarpus altilis (incisa)</i>	Fruta Pão	Folha	Chá	2	4
<i>Bauhinia fortificata</i>	Pata de Vaca	Folha	Chá	11	21
<i>Cecropia adenopus</i>	Imbaúba	Folha	Chá	1	2
<i>Cissus sicyoides</i>	Insulina	Folha	Chá	5	9
<i>Citrus limon</i>	Limão	Folha	Chá	1	2
<i>Cucumis anguria</i>	Maxixe	Fruto	Suco	2	4
<i>Mangifera indica</i>	Manga	Folha	Chá	2	4
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira Santa	Folha	Chá	1	2
<i>Phyllanthus niruri</i>	Quebra Pedra	toda a planta	Chá	1	2
<i>Quassia amara</i>	Pau Tenente	Folha	Chá	3	6
<i>Solanum melongela</i>	Berinjela	Fruto	Suco	3	6
<i>Syzygium cumini</i>	Azeitona doce	Folha	Chá	8	15
<i>Tamarindus indica</i>	Tamarindo	Folha	Chá	5	9
<i>Turnera guynensis</i>	Chanana	Raiz e folha	Chá	2	4
Totais				53	100

Apenas 16 pacientes (15%) relataram o uso de plantas para outras patologias. Foram relatadas 9 espécies vegetais utilizadas para tratamento de:

hipertensão arterial, hipercolesterolemia, problemas cardíacos, hepáticos, digestivos, renais e outros (Tabela 3).

Ao ser abordado sobre a origem da informação quanto a ação hipoglicemiante das espécies utilizadas, 35% relataram ter adquirido o conhecimento com outros pacientes com diabetes, 25% a partir de amigos, 18% com parentes, 15% em revistas e TV e 7% por indicação de profissionais de saúde.

A avaliação quanto ao local de obtenção das espécies vegetais utilizadas mostrou que a maior parte pessoas utilizam espécies cultivadas nos próprios jardins, quintais e vasos (39%), vizinhos e amigos (21%), mercados e/ou feiras (24%), hortos (6%), vendedores nas ruas (6%) e outras fontes não listadas (4%).

Tabela 3: Plantas medicinais utilizadas na forma de chá por pacientes diabéticos para tratamento de outras doenças em São Luís - MA, Brasil.

Espécie vegetal		Parte utilizada	Uso Popular	Pacientes	
Nome Científico	Nome Popular			Nº	<i>f</i>
<i>Allium sativum</i>	Alho	Bulbo	Anti-hipertensivo	3	19
<i>Arundo donax</i>	Cana da Índia	Folha	Pedra nos Rins	1	6
<i>Citrus aurantiifolia</i>	Lima	Folha	Calmante	1	6
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim Limão	Folha	Calmante	3	19
<i>Melissa officinalis</i>	Erva Cidreira	Folha	Calmante	3	19
<i>Plectranthus barbadus</i>	Boldo	Folha	Afecções no Fígado	1	6
<i>Phyllanthus niruri</i>	Quebra Pedra	Toda	Pedra nos Rins	2	13
<i>Solanum melongela</i>	Berinjela	Fruto	Colesterol	1	6
<i>Syzygium cumini</i>	Azeitona doce	Fruto	Colesterol	1	6
			Totais	16	100

Do total das espécies citadas nas entrevistas 8 estão incluídas na lista de 71 plantas medicinais, divulgada pelo Ministério da Saúde do Brasil, como sendo passíveis de serem utilizadas em medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2009). Entre elas pelo menos duas são indicadas para diabetes (Tabela 4).

Tabela 4 - Plantas medicinais citadas na entrevista que também fazem parte da relação do Ministério da Saúde do Brasil e seus respectivos usos terapêuticos.

Espécie vegetal		
Nome Científico	Nome popular citado na entrevista	Indicações descritas no RENISUS ^a
<i>Allium sativum</i>	Alho	Antisséptico, anti-inflamatório e anti-hipertensivo
<i>Anacardium occidentale</i>	Caju	Antisséptico e cicatrizante
<i>Arrabidaea chica</i>	Pariri, cajiru	Anti-inflamatório e antimicrobiano
<i>Bauhinia fortificata</i>	Pata de Vaca	Afecções urinárias, diabetes.
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira Santa	Antisséptica, anti-inflamatório e cicatrizante.
<i>Phyllanthus niruri</i>	Quebra Pedra	Diurético e regulador do ácido úrico
<i>Plectranthus barbatus</i>	Boldo	Tônico, Afecções do fígado, hepatite.
<i>Syzygium cumini</i>	Azeitona doce	Hemorragias, desinteria e diabetes

a: RENISUS = Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (BRASIL, 2009).

Discussão

O número de pessoas com diabetes mellitus tem aumentado drasticamente ao longo das últimas décadas. Plantas com atividade hipoglicemiante vêm sendo utilizadas para tratamento da diabetes mellitus em todo o mundo. As plantas são fontes de constituintes químicos com propriedades biológicas eficazes na diabetes (KHAN et al, 2012).

Neste estudo foi feito o levantamento etnofarmacológico considerando o uso de plantas entre os pacientes diabéticos, cadastrados num Hospital Universitário em São Luís, Maranhão, Brasil. Dos 107 pacientes entrevistados, 49 (46%) relataram usar plantas medicinais como tratamento complementar para controle da diabetes. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al (2008) em Jequié-BA onde 40% dos diabéticos utilizavam plantas medicinais como tratamento coadjuvante.

Das 25 espécies citadas, 16 foram usadas para tratamento da diabetes (tabela 2) e 9 para tratamento de outras patologias associadas a doença (tabela 3). Esses resultados corroboram com Carvalho et al (2005), que realizou um estudo em João Pessoa - PB onde 14 plantas foram relatadas para tratamento da diabetes, onde *Bauhinia fortificata*, *Phyllanthus niruri*, *Cissus sicyoides* foram também aqui citadas. Afolayan; Sunmonu (2010) realizaram levantamento etnobotânico entre 2005 e 2008, na África do Sul, sobre plantas utilizadas para tratamento da diabetes e encontraram 32 espécies, como usadas como hipoglicemiantes entre os africanos.

Segundo Barbosa-Filho et al (2005) no Brasil existe cerca de 200 espécies vegetais frequente e empiricamente usadas no controle da diabetes. Entre elas 52 tiveram a atividade hipoglicemiante comprovada em ensaios pré-

clínicos. Entre as 52 espécies listadas, sete também foram aqui descritas, são elas: *Anacardium occidentale*, *Bauhinia fortificata*, *Cissus sicyoides*, *Citrus sp*, *Mangifera indica*, *Phyllanthus niruri* e *Syzygium cumini*.

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) lista 71 espécies de plantas medicinais que poderão ser usadas como medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2009). Destas 8 espécies constam neste estudo. Esta lista serve de base para a ampliação do número de fitoterápicos que hoje são financiados pelo governo federal do Brasil. Atualmente, só dois fitoterápicos, feitos à base de *Mikania sp* - guaco (para tosse) e *Maytenus sp* - espinheira-santa (para úlcera e gastrite), são financiados pelo Governo do Brasil.

A fitoterapia resgata a cultura tradicional do uso das plantas medicinais pela população, possibilitando a ampliação do seu acesso, a prevenção de agravos e da promoção, manutenção e recuperação da saúde, baseada em modelo de atenção humanizada e centrada na integralidade do indivíduo, contribuindo para o fortalecimento dos princípios fundamentais do SUS (BRASIL, 2006)

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população utilizam plantas ou preparações destas para cuidados em saúde. O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento dessa terapêutica, com a maior diversidade vegetal do mundo e ampla sociodiversidade. Assim o uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e as tecnologias que possam validar cientificamente este conhecimento são desejáveis (BRASIL, 2006).

Quanto à forma de obtenção das espécies vegetais utilizadas pelos

entrevistados, 90% são obtidas domesticamente, pois são cultivadas em quintais pela própria comunidade, ou comercializadas em feiras livres e mercados municipais. E sempre bom alertar para ao risco que essas praticas guardam, devido ao uso de espécies sem identificação adequada, obtidas em hortas e quintais, conforme mostrou Teixeira; Melo (2006). O que poderia explicar a baixa eficácia em reduzir a glicemia sanguínea, tendo em vista que nos grupos que utilizaram plantas associadas aos medicamentos alopáticos os valores glicêmicos médios e a dispersão foram maiores.

O chá foi à forma de preparo mais citada (92%), da mesma forma que anteriormente descrita por NEGRELLE; FORNAZZARI (2007). Os estudos que descrevem o consumo de plantas apontam os chás como a principal forma de preparação para uso, possivelmente pela facilidade no preparo (TEIXEIRA; NOGUEIRA, 2005). O que também explicaria a maior predominância no uso das folhas (72%), seguida dos frutos (16%), em decorrência da facilidade de acesso e conservação. Dados confirmados pelos relatos de Teixeira; Melo (2006) que ao avaliarem o uso de plantas medicinais no município de Jupi, Pernambuco, Brasil também verificaram que os órgãos vegetais mais referidos foram as folhas (48%) e frutos (13%).

Quanto ao conhecimento da ação fitoterápica das espécies com ação hipoglicemiante, os resultados mostram que a maioria adquiriu esse conhecimento com outros diabéticos ou com amigos e parentes, da mesma forma que o relatado no estudo realizado em Jequié, BA (SILVA et al, 2008), indicando que a utilização de plantas como medicamento ainda ocorre, na maioria das vezes, de maneira empírica.

Estudos realizados com *Bauhinia forticata*, conhecida popularmente como "pata-de-vaca", melhora o metabolismo de carboidratos em ratos diabéticos (PEPATO et al 2002), inibe a glicogênese e tem efeito similar à insulina ou sulfoniluréias, Também inibe a neoglicogênese de maneira similar à biguanida. A fração *n*-butanólica do extrato das folhas de *B. forticata* foi efetiva em reduzir a glicose, possivelmente por reduzir sua absorção intestinal (SILVA et al, 2002). Adicionalmente, *B. forticata* reduz a concentração de triglicerídeos e colesterol, sendo útil no tratamento do diabetes tipo 2 (LINO et al, 2004).

Outra espécie aqui relatada para tratamento do diabetes e colesterol foi *Syzygium cumini* (sinonímias: *Syzygium jambolanum*, *Eugenia jambolana*, *Syzygium jambos*), popularmente conhecida como jambolão (BRAGANÇA, 1996). O Extrato Bruto Hidroalcolico das folhas de *S. cumini* apresentou atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica em animais diabéticos podendo ser uma alternativa terapêutica no tratamento da diabetes (SCHOENFELDER et al, 2010). Segundo Zanoello et al (2002) *S. cumini* controla a hiperglicemia pós-prandial, em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1. Das folhas de *Syzygium cumini* foram isolados triterpenóides, ácido gálico, metilgalato, canferol, ácido elágico, ácido clorogênico, nilocitina e óleos essenciais (TIMBOLA et al, 2002). Recentemente Khan et al (2012) listou a espécie entre as que apresentam ação anti-diabetes.

Arrabidaea chica, conhecida como pariri, é amplamente utilizada pela população e popularmente., principalmente na região Amazônica. Possui como princípios ativos o ácido anisíaco, cajurina, taninos, ferro assimilável e cianocobalamina, as principais propriedades compreendem ação anti-inflamatória e cicatrizante. A resistência a insulina (RI) tem sido associada à

estimulação de progenitores eritrocitários e ao aumento de marcadores inflamatórios, incluindo as citocinas TNF α e IL-6 (ELLINGER et al, 2006). Considerando que a diabetes tem um forte componente inflamatório é razoável supor que o seu uso se fundamente nesta atividade.

A atividade anti-hiperglicêmica de *Tamarindus indica* L., tamarindo, se deve a propriedade em aumentar a concentração de glicogênio muscular e hepático, pela diminuição da atividade da glicose-6- fosfatase, o que acaba por reduzir a concentração circulante de glicose. Além disso, como também tem ação sobre a regulação de lipídios, interfere na concentração de insulina em ratos diabéticos (MAITI et al, 2005).

Cissus sicyoides, conhecida como insulina vegetal, é muito utilizada pela população na forma de infusão como coadjuvante para o tratamento da diabetes. Estudos pré-clínicos quanto a atividade antidiabética da *Cissus sicyoides* tem resultados controversos. A eficácia de *C. sicyoides* foi confirmada em ensaios pré-clínicos (MORI et al, 2001; PEPATO et al, 2003; MIURA et al, 2006) e clínicos (SANTOS et al, 2009). Nos ensaios clínicos, além da eficácia do tratamento em pacientes intolerantes a glicose e em diabéticos tipo 2, foi observada a baixa toxicidade do produto, pois não foram detectadas alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e eletrocardiográficas significantes, confirmando a segurança da utilização da espécie no controle da doença em pacientes diabéticos.

Segundo Sokeng et al (2007) as folhas de *Anacardium occidentale* apresentam efeito hipoglicemiante em ratos nos quais a diabetes foi induzida por estreptozotocina. Pelo menos dois tipos principais de compostos estão associados ao potencial hipoglicemiante do extrato: compostos solúveis em n-

hexano e aqueles solúveis em acetato de etila.

A berinjela, *Solanum melongena*, é espécie muito utilizada no tratamento da diabetes e no controle do colesterol, inclusive como foi relatado pelos entrevistados neste estudo. Jorge et al (1998) afirmam o extrato e o suco de berinjela, têm sido utilizados para diminuir as taxas de colesterol total e de LDL - colesterol. O uso da ração de berinjela integral (1,01g% de pectina solúvel) e de casca de berinjela (0,37g% de pectina solúvel) por ratos diabéticos resultou em redução da glicemia, sugerindo que na casca de berinjela existem compostos termo estáveis com ação hipoglicêmica; Segundo os autores o efeito é possivelmente relacionado ao aumento na liberação de insulina e da captação de glicose pelas células insulino-dependentes nos tecidos (DERIVI et al, 2002).

Outras espécies foram relatadas para tratamento de hipertensão como o *Allium sativum* e *Cymbopogon citratus*. Os efeitos agudos da administração endovenosa das frações hexânicas dos dois vegetais e de suas associações foram igualmente potentes em reduzir a pressão arterial de ratos, embora a associação dos dois extratos não tenha apresentado efeito potencializador da ação hipotensora.

A ingestão oral do extrato de alho (100mg/Kg) melhora as funções cardiovasculares, previne anormalidades no perfil lipídico e aumenta a atividade fibrinolítica, com diminuição da agregação plaquetária em ratos diabéticos. Adicionalmente o alho aumenta os níveis plasmáticos de insulina e como consequência há redução da glicose sanguínea (SINGI et al, 2006). Apresenta ação antiaterosclerótica e previne complicações cardiovasculares em ratos diabéticos (GROVER et al, 2002). resultados que se coadunam com

as indicações populares e com os relatos etnobotânicos dos pacientes diabéticos aqui avaliados, os quais usam o alho para tratar hipertensão entre outras alterações .

Quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) é uma planta usada popularmente como diurética e para tratar cálculo renal. Neste estudo ela foi relatada tanto para o tratamento do diabetes quanto para tratamento das patologias associadas. Em estudos clínicos, a administração oral da planta inteira (5mg/dia, em doses divididas, durante 10 dias), a pacientes hipertensos, reduziu a glicemia (5-50mg) em diabéticos, como também em não diabéticos, com significativa redução da pressão sistólica (GROVER et al, 2001).

O presente estudo mostra a utilização de plantas em aditivo a terapia alopática, para tratar diabetes e suas complicações. O uso em geral é feito com base no conhecimento popular, mostrando que ensaios clínicos são necessários para confirmar a real eficácia e pacientes, bem como para avaliar a melhor posologia das espécies, de forma a contribuir no desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de plantas com ação hipoglicemiante.

Referências

ABDEL-HASSAN IA, ABDEL-BARRY JA, MOHAMMEDA ST. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol** **71**: 325-330, 2000.

AFOLAYAN AJ, SUNMONU TO. In vivo Studies on Antidiabetic Plants Used in South African Herbal Medicine. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, 47 : 98-106, 2010.

ALARCON-AGUILAR FJ, ROMAN-RAMOS R, FLORES-SAENZ JL, AGUIRRE-GARCIA F. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice **Phytother Res** **16**: 383-386, 2002.

BARBOSA-FILHO JM, MARTINS VKM, RABELO LA, MOURA MD, SILVA MS, CUNHA EVL, SOUZA MFV, ALMEIDA RN, MEDEIROS IA. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. **Rev Bras Farmacogn**; **16**: 421-446, 2006.

BRAGANÇA LAR. Aspectos gerais no preparo e no controle de qualidade de plantas e fitoterápicos hipoglicemiantes. In: SIXEL PJ. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Rio Janeiro: Universidade Federal Fluminense, 1996. Cap.5, p.105-122.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde - Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 132 p.: il. - (Série G. Estatística e Informação em Saúde)

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS (2009). Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência

Farmacêutica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde)

CARVALHO ACB, DINIZ MFFM, MUKHERJEE R. Hypoglycemic activity studies of some plants used in diabetes treatment in Brazilian traditional medicine. **Rev. Bras. Farm.**, **86**: 11-16, 2005.

CECHINEL-FILHO V, YUNES RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim Nova**; **21**: 99-105, 1998.

DERIVI SCN, MENDEZ MHM, FRANCISCONI AD, SILVA CS, CASTRO AF, LUZ DP. Efeito hipoglicêmico de rações à base de berinjela (*Solanum melongena*, L.) em ratos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, **22**: 164-169, 2002.

DIETERT, R.R. Role of developmental immunotoxicity and immune dysfunction in chronic disease and cancer. **Reprod Toxicol**; **31**: 319–26, 2011.

ELLINGER, V. C. M.; CARLINI, L. T.; MOREIRA, R. O.; MEIRELLES, R. M. R.

Relation between Insulin Resistance and Hematological Parameters in a Brazilian Sample. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, **50**: 114-117, 2006.

EZENWAKA CE, KALLOO R, UHLIG M, ECKEL J: Relationship between adiponectin and metabolic variables in Caribbean offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. **Horm Metab Res**, **36**: 238 - 242, 2004

GROVER J. K, VATS V. Shifting paradigm .from conventional to alternative medicine. . An introduction on traditional Indian Medicine. **Asia Pacific Biotech News**. **5**: 28-32. 2001.

GROVER J. K, YADAV S., VATS V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. **J Ethnopharmacol**. **81**: 81 - 100. 2002.

HOU CC, LIN SJ, CHENG JT, HSU FL. Antidiabetic dimeric guianolides and a lignan glycoside from *Lactuca indica*. **J Nat Prod**; **66**: 625 - 629, 2003.

JORGE, P. A.R.; NEYRA, L.C.; OSAKI, R.M.; ALMEIDA, E.; BROGAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lípides plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arq. Bras. Cardiol.**, **70**: 87-91, 1998.

KHAN V, NAJMI AK, AKHTAR M, AQIL M, MUJEEB M, PILLAI KK. A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. **J Pharm Bioallied Sci.**; **4**: 27 - 42, 2012.

LI WL, ZHENG HC, BUKURU J, De KIMPE N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol**; **92**: 1-21, 2004.

LINO, C. D.; DIOGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A. P. G.; NETO, M. A.; ALVES, R. S.; De QUEIROZ, M. G. R.; De SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biol. Pharm. Bull.**, **27**: 125- 127, 2004.

MAITI R, DAS UK, GHOSH D. Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. **Biol Pharm Bull** **28**: 1172-1176, 2005.

MARLES RJ, FARNSWORTH NR. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, **2**: 137-189, 1995.

MIURA, T.; SHINDOU, C.; ZHANG, W.; SUZUKI, I.; ISHIDA, T. Antidiabetic activity of *Cissus sicyoides* in KK-A_Y mice. **J. Trad. Med.**, **23**: 89-91, 2006.

MORI,T.; NISHIKAWA, Y.; TAKATA, Y.; KASHIUCHI, N.; ISHIHARA, N. Effect of insulina leaf extract on development of diabetes: comparison between normal, streptozotocin-induced diabetic rats and hereditary diabetic mice. **J Japan Soc Nutr Food Sci**, **54**: 197-203, 2001.

NEGRELLE, R.R.B.; FORNAZZARI, K.R.C. Estudo etnobotânico em duas comunidades rurais (Limeira e Ribeirão Grande) de Guaratuba (Paraná, Brasil). **Rev. Bras. Plant. Med.**, **9**: 36-54, 2007.

PEPATO MT, KELLER EH, BAVIERA AM, KETTELHUT IC, VENDRAMINI RC, BRUNETTI IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **J Ethnopharmacol**. **81**: 191-197, 2002.

PEPATO MT, BAVIERA AM, VENDRAMINI RC, PEREZ MPMS, KETTELHUT IC, BRUNETTI IL. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnol Appl Biochem**, **37**: 15 - 20, 2003.

- RATES SMK. Plants as sources of drugs. **Toxicon** **39**: 603 - 613, 2001.
- SAID O, KHALIL K, FULDER S, AZAIZEH H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel the Golan Heights and the West Bank Region. **J Ethnopharmacol**; **83**: 251-265, 2002.
- SANTOS HB, MODESTO FILHO J, VASCONCELOS THC, PEREIRA FSB, RAMALHO JA, DANTAS JG, SANTOS EB. Ensaio clínico com as folhas de *Cissus sicyoides* L.(vitaceae) em pacientes intolerantes à glicose e em diabéticas tipo 2. **RBAC**, **41**: 35 - 42, 2009.
- SILVA JPA, SAMPAIO LS, OLIVEIRA LS, REIS LA. Plantas medicinais utilizadas por portadores de diabetes mellitus tipo 2 para provável controle glicêmico no município de Jequié-BA. **Rev.Saúde.Com**; **4**: 10 - 18, 2008.
- SILVA, F. R. M. B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M. G.; VIEIRA WILLRICH, M. A.; de SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forticata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol**, **83**: 33 - 37, 2002.
- SINGI G, DAMASCENO DD, A'ANDREA ED, SANTOS MH, SILVA GA. Efeitos Agudos das Frações Hexânicas de Alho (*Allium sativum* L.), de Capim-Limão [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf] e de suas Associações sobre a Pressão Arterial de Ratos Anestesiados. **Acta Farm. Bonaerense** **25**: 108 - 111, 2006.
- SOKENG SD, LONTSI D, MOUNDIPA PF, JATSA HB, WATCHO P, KAMTCHOWING P. Hypoglycemic Effect of *Anacardium occidentale* L. Methanol Extract and Fractions on Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **J. Med. Sci.**, **2**: 133-137, 2007.
- SCHOENFELDER T, WARMLIN CZ, MANFREDINI MS, PAVEI LL, RÉUS JV, TRISTÃO TC, FERNANDES MS, COSTA-CAMPOS L. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae. in diabetic rats. **Braz. J. Pharmacogn**, **20**: 222-227, Abr./Mai. 2010.
- TEIXEIRA ER, NOGUEIRA JF. O uso popular de ervas terapêuticas no cuidado do corpo. **Rev Gaucha de Enferm**, **26**: 231-41. 2005.
- TEIXEIRA SA, MELO JIM. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil. **IHERINGIA**, **61**: 5-11, 2006.

TIMBOLA, A.K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F.D.; PIZZOLATTI, VOLPATO GT, DAMASCENO DC, CALDERON IMP, RUDGE MVC. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle de diabetes mellitus. **Rev Bras Plantas Med.**; 4: 35 - 45, 2002.

ZANOELLO AM, MAZZANTI CM, GINDRI JK, FILAPPI A, PRESTES D, CECIM M. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra diabetes mellitus induzido por aloxano em ratos. **Acta Farm Bonaerense** 21: 31-36, 2002.

Salivary evaluation of pediatric patients with cancer, before and after antineoplastic treatment

Rosane N. M. Guerra¹, Joao J. Oliveira-Junior¹, Jose Carlos E. Mouchrek-Filho², Silvana A. Liberio¹, Monica V. V Lima¹, Deborah B. S. Paim¹, Carolina X. L. Brito¹, Cristina Mendonça¹, Flavia Raquel F. Nascimento¹, Antonio Luiz A. Pereira²

¹Laboratory of Immunophysiology, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brazil;
²Department of Odontology, Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brazil

AIMS: This study evaluated the salivary biochemical and immunological status of children with cancer undergoing to antineoplastic treatment in an attempt to identify alternatives for a less invasive and less painful monitoring of these patients.

MATERIALS AND METHODS: Unstimulated whole saliva samples were obtained from 115 children without cancer (control) and 32 children with cancer (CA). Children with cancer were also evaluated after antineoplastic treatment (CAT, $n = 17$). The salivary concentrations of glucose, triglycerides, total cholesterol, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase (GGT), urea, insulin, thyroid-stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T3), levothyroxine (T4), and immunoglobulin A (IgA) were determined.

RESULTS: Acute lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia, and Hodgkin's lymphoma were the most frequent cancers, although cases of non-Hodgkin's lymphoma, medulloblastoma, ependymoma, osteosarcoma, neuroblastoma, Ewing's sarcoma, and endodermal sinus tumor were also observed. The salivary concentration of cholesterol, triglycerides, or GGT did not differ between groups. Instead, the concentrations of alkaline phosphatase and T4 were higher in patients with cancer, irrespective of treatment. TSH levels were higher in the CA group and urea concentration was lower in the CAT group. T3 was undetectable in all groups. Antineoplastic treatment increased the glucose level and decreased the insulin concentration. Salivary concentration of total IgA was lower in children with cancer, irrespective of treatment.

CONCLUSIONS: Cancer and antineoplastic treatment affected biochemical and immunological parameters in the saliva of children, shedding new light on the potential usefulness of saliva for monitoring children with cancer, especially to patients undergoing immunosuppressive therapy. *J Oral Pathol Med* (2012)

Keywords: cancer; glucose; IgA; insulin; thyroid hormones

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; CA, Children with cancer; CAT, Children with cancer after antineoplastic treatment; GGT, gamma-glutamyltransferase; IgA, immunoglobulin A; T3, triiodothyronine; T4, levothyroxine; TSH, thyroid-stimulating hormone.

Introduction

The prevalence of cancer among children ranges from 1 to 3% in most populations. Cancer in children is relatively rare when compared to tumors affecting adults. In Brazil, the prevalence of childhood cancer varies among the 28 cities where Population-Based Cancer Registries have been implemented. Leukemias, especially acute lymphocytic leukemia, are the most frequent childhood cancers, followed by central nervous system tumors. Lymphomas, especially non-Hodgkin's lymphoma, occupy third position among pediatric cancers (1).

Oncology care includes curative and palliative measures that are designed to both re-establish health and improve the quality of life of the patient, such as diagnosis, treatment, control of disease progression, monitoring, and pain relief alternatives (2). Pediatric patients with cancer are submitted to chemotherapy or radiotherapy, or to a combination of both. These treatments immunosuppress and therefore interfere with the function of various organs and systems, including the endocrine and immune system. As a consequence, these patients require routine clinical follow-up because of the secondary effects of these medications and related complications (3). All alterations are generally measured in blood, although many of them can also be evaluated in saliva (4), with variable levels of correlation, but as an important and useful way to evaluating physiologic alterations (5).

Whole saliva is a mixture of various glandular saliva, nasal and bronchial secretion, blood derivatives including hormones, and immune system molecules (6). The wide variety of salivary components permits the use of

Correspondence: Rosane N. M. Guerra, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses s/nº - CCBS, Bl. 1, room 1A, São Luis, Maranhão, CEP: 65085-580, Brazil. Tel: +55 98 33018548, E-mail: rmmguerra@pq.cnpq.br
Accepted for publication April 13, 2012

saliva for the monitoring of drug treatments, use of illicit drugs, and endocrine alterations (5). Additional advantages include the non-invasive and simple collection of saliva because no special equipment is necessary. Therefore, salivary assessment has several advantages over blood examination, especially in children, including its easier execution, faster results, and less discomfort. In addition, salivary hormone and biochemical tests, as well as the analysis of antibody secretion are widely used for laboratory investigation (6, 7). As chronic childhood diseases such as cancer affect the development of the immune system, causing organ dysfunction (8), salivary assessment is an interesting alternative to evaluate the effects of antineoplastic treatment in these patients.

In this study, it was investigated that the use of whole saliva for the monitoring of pediatric patients with cancer before and after antineoplastic treatment by analyzing immunological, biochemical, and hormonal parameters in relation to normal levels found in health individuals.

Methods

Study design and sample

A prospective cohort study using convenience sampling was conducted between August 2008 and August 2009. The sample was selected at public schools in Sao Luis and at Casa de Apoio do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB), a cancer referral center in the state. The participants and their legal guardians received detailed information about the risks and procedures adopted in this study, and saliva was only collected after they had signed the free informed consent form. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Maranhao (No. 23115-005173/2008-84).

The participants were divided into three groups: (i) the control group consisted of 115 children of both genders without cancer ranging in age from 7 to 12 years, (ii) The CA group comprised all 32 children of both genders with cancer ranging in age from 3 to 15 years, who were seen at IMOAB prior to antineoplastic treatment. Included in this group were children registered at the Oncology Service of IMOAB who underwent antineoplastic treatment at the service, (iii) The CAT group consisted of 17 children of the CA group who remained after 6 months of antineoplastic treatment. Thus, each child of the CA group was used as its own control after treatment. The small number of children in this group was as a result of the large number of deaths.

The children receiving different therapeutic modalities (chemotherapy, radiotherapy, or a combination of both) were classified into one group, called CAT, because comparison of the results between these subgroups revealed no significant differences.

Collection of saliva

Approximately 2 ml of unstimulated saliva was collected into a sterile flask in the morning 2 h after the first

meal and after mouth rinsing with filtered water. The samples were centrifuged and the supernatant was stored in microtubes at -20°C for subsequent analysis. The salivary parameters below were chosen to evaluate the influence of disease and treatment on specific variables of intermediary metabolism (glucose, triglycerides, total cholesterol, urea, gamma-glutamyltransferase (GGT), and alkaline phosphatase (ALP)), endocrine metabolism [insulin, thyroid-stimulating hormone (TSH), T3, and T4], and humoral immunity (IgA).

Biochemical analysis

The concentrations of glucose, total cholesterol, triglycerides, urea, ALP, and GGT were measured by automated procedures (Architect c8000; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) in saliva volumes determined by the manufacturer. Individual samples were tested in duplicate.

Enzyme immunoassay for the measurement of IgA

Total IgA concentration was measured in saliva samples as described by Johnstone and Thorpe, 1987 (9). Antibodies against human IgA (Sigma, St. Louis, MO, USA) and recombinant IgA (eBiosciences, San Diego, CA, USA) were used.

Determination of insulin and thyroid hormones

The concentrations of insulin and thyroid hormones (TSH, T3, and T4) were assayed by chemoluminescence (Immulite 2000; Siemens, Munich, Germany) according to manufacturer instructions.

Statistical analysis

The results were analyzed using the Student's *t*-test, analysis of variance (ANOVA), and the Tukey-Kramer post-test. The level of significance for rejection of the null hypothesis was set at 5% ($P < 0.05$).

Results

Acute lymphoid leukemia was diagnosed in 19 (59.3%) children of the CA group and Hodgkin's lymphoma in 15.6%. The remaining children of the CA group (25.1%) had other types of tumors as shown in Table 1.

Table 2 shows the results of salivary biochemical analysis. Total cholesterol, triglycerides, and GGT concentrations were unchanged in patients with cancer, whereas ALP levels were higher and urea concentration was significantly reduced in the groups with cancer, irrespective of treatment.

Thyroid-stimulating hormone concentration was only higher in children with cancer before antineoplastic treatment. Antineoplastic treatment reduced TSH to levels similar to those seen in the control group (Fig. 1A). In contrast, salivary T4 concentrations were higher in children with cancer, irrespective of treatment (Fig. 1B). T3 was not detected in the saliva of any of the groups.

Figure 2 illustrates an inverse relationship between insulin and glucose in children of the CAT group, with treatment causing a reduction in insulin concentration

Table 1 Distribution of pediatric tumors according to cancer type, sex, age, and type of treatment

Cancer type	Sex		Age (average)	Treatment	Deaths (n)
	M	F			
Acute lymphocytic leukemia	11	7	9.8	C	5
Acute myeloid leukemia	1	0	9	R	1
	4	0	11	C	1
	4	0	7.8	C	1
Hodgkin's lymphoma	1	0	8	R	1
Non-Hodgkin lymphoma	1	0	6	C	1
Medulloblastoma	1	0	12	C, R	1
Ependymoma	0	1	8	C, R	1
Osteosarcoma	1	0	15	C	1
Ewing's sarcoma	0	1	12	C	0
Nephroblastoma	1	0	8	C, R	1
Endodermic tumor	0	1	12	R	0
Total	22 ^a	10 ^a			14 ^a

M, male; F, female; C, Chemotherapy; R, Radiotherapy.
^amale: 68%; female: 32%; death: 43.8% (n = 32 patients).

Table 2 Salivary concentration of total cholesterol, triglycerides, gamma- glutamyltransferase, alkaline phosphatase, and urea in children without cancer (control) and in children with cancer before (CA) and after antineoplastic treatment (CAT)

	Control ^a	CA	CAT
Alkaline phosphatase (U.I.)	14.5 ± 7.4 ^b	26.6 ± 7.9*	26.8 ± 8.9*
Cholesterol (mg/dl)	3.1 ± 2.5	3.9 ± 2.1	3.9 ± 2.6
GGT (U/l)	7.3 ± 5.2	8.8 ± 5.4	8.9 ± 6.6
Triglycerides(mg/dl)	3.3 ± 1.4	3.4 ± 1.2	3.3 ± 1.8
Urea (mg/dl)	25.9 ± 9.9	24.8 ± 3.0	15.0 ± 2.0*†

GGT, gamma-glutamyltransferase.
^aControl (n = 115); CA (n = 32) and CAT (n = 17).
^bResults are reported as the mean ± standard deviation.
*P < 0.05 when compared to the control group and (†) when compared to CA group.

(Fig. 2A) and an increase in glucose levels (Fig. 2B). These parameters were unchanged in the other groups.

Secretion of total IgA in saliva was always lower in children with cancer, irrespective of antineoplastic treatment (Fig. 3).

Discussion

The present results demonstrated that a high frequency of leukemia (62.5%) among the children studied, followed by lymphomas (18.7%), central nervous system tumors (6.2%), and sarcomas (6.2%). Although this distribution is similar to that seen in other Brazilian cities (1), the frequencies differed when compared to other cancer registries, possibly because only one period was analyzed and the study only included children attended at one cancer support center of a single referral hospital in Sao Luis.

According to the Brazilian Institute of Cancer-INCA (1) cancers are relatively rare in children and adolescents; approximately 12 500 individuals less than age

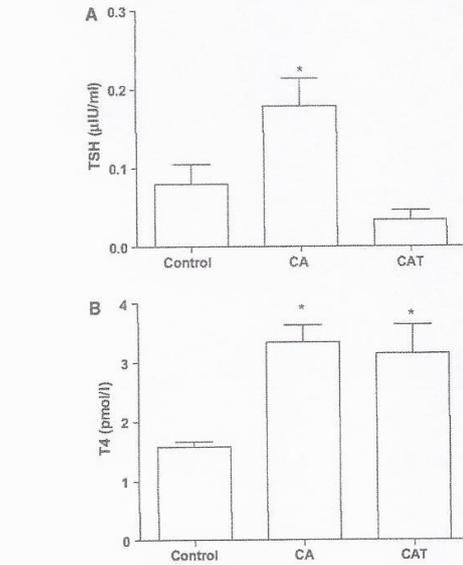


Figure 1 Salivary concentration of TSH (A) and T4 (B) in children without cancer (control) and in children with cancer before (CA) and after antineoplastic treatment (CAT). Results are reported as the mean ± standard deviation. * p < 0.05 compared to the control group. (Control: n = 115; CA: n = 32 and CAT: n = 17).

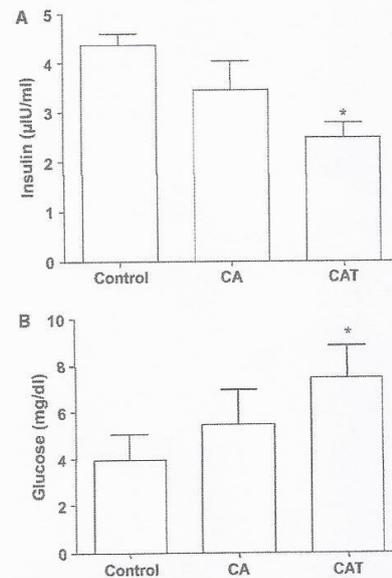


Figure 2 Salivary concentration of insulin (A) and glucose (B) in children without cancer (control) and in children with cancer before (CA) and after antineoplastic treatment (CAT). Results are reported as the mean ± standard deviation. (*) p < 0.05 compared to the control group. (Control: n = 115; CA: n = 32 and CAT: n = 17).

20 years are diagnosed with a new malignancy yearly. The most prevalent cancers observed before 20 years of age include leukemia, tumors of the central nervous

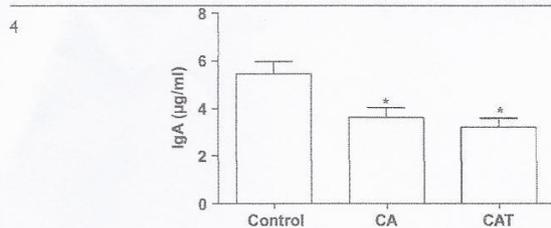


Figure 3 Salivary concentration of total IgA, detected by ELISA, in children without cancer (control) and in children with cancer before (CA) and after antineoplastic treatment (CAT). Results are reported as the mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$ compared to the control group. (Control: $n = 115$; CA: $n = 32$ and CAT: $n = 17$).

system, lymphomas, including Hodgkin's disease, and tumors of bone and soft tissue.

It was determined many salivary parameters including the concentration of alkaline phosphatase, GGT, triglycerides, urea, cholesterol, insulin, Triiodothyronine (T3), Levothyroxine (T4), TSH, and Immunoglobulin A (IgA). The parameters evaluated here were chosen considering the procedures adopted for the assessment and follow-up of pediatric patients with cancer adopted by INCA (1).

Tumor development causes hepatotoxicity, disturbances on immunological (8) and hormonal imbalance and also metabolic syndrome including insulin resistance, elevated plasma glucose, and dyslipidemia (10). All alterations are generally measured in blood, although many of them can also be evaluated in saliva (4). Saliva has many diagnostic uses and is especially valuable in the young, the old and infirm and in large-scale screening and epidemiologic studies (5), mainly to oral evaluation of pediatric patients with cancer.

According Karjalainen et al. (11), saliva cholesterol concentration reflects serum concentration to some extent and can be used to the diagnosis of high serum cholesterol levels. Salivary total cholesterol and triglycerides were unchanged in children with cancer even after treatment, although specific groups of childhood tumors such as acute lymphoid leukemia, central nervous system tumors, and sarcomas are known to cause metabolic syndrome as a consequence of hormone deficiencies or antineoplastic treatment (10).

A significant increase in ALP, but not of GGT, was observed in the CA and CAT groups. Combined analysis of these enzymes is useful for the evaluation of bile duct injury. However, the exclusive increase in ALP levels may indicate a bone origin because alterations in bone metabolism as a result of cancer progression are common, especially in patients undergoing chemotherapy (12). In contrast, Crofton et al. (13) found no increase in ALP in pediatric populations with cancer. However, in that study the parameters were measured in blood and not in saliva as in the present investigation.

The reduction in salivary urea observed after treatment might be attributed to a lower protein intake as a consequence of nausea and vomiting, or of protein absorption disorders because of the destruction of

intestinal villi, frequent complications of cancer and antineoplastic treatment (14), mainly in children.

The present results showed an increase in TSH concentration in the CA group, which was associated with an increase in T4 during the same period. On the other hand, in the CAT group, T4 concentrations remained elevated irrespective of TSH. Cancer and anticancer therapies are known to compromise endocrine functions in children (10, 13), as observed for thyroid function in the present study. Tumor development can interrupt thyroid regulation and persistence of this stimulus results in the disordered production of its hormones (15) or of TSH receptor autoantibodies (16, 17).

Hyperthyroidism (low TSH and elevated T4), while far less prevalent than hypothyroidism in childhood cancers (15, 18), does develop at an increased rate in certain subsets of childhood cancer, mainly on those patients with Hodgkin's disease and on those submitted to radiation (18) as observed in the present study.

An important reduction in the salivary concentration of insulin was observed in patients of the CAT group (Fig. 2A), a finding possibly related to the increase in salivary glucose concentration that was higher in this group when compared to the other groups (Fig. 2B). As insulin plays a key role in glycemic regulation, this reduction may have influenced the increase in salivary glucose, probably reflecting plasma diffusion of insulin to the saliva. The action of insulin is affected by physiological states of circulating factors. The secretion or excess administration of glucocorticoids, glucagon, catecholamines, and growth hormone induces insulin resistance (19). As observed in the present study, both the development of cancer and antineoplastic treatment can affect the metabolism of patients, altering insulin production and glucose regulation, although triglyceride and total cholesterol concentrations remained stable. According to Yetgin et al. (20), the neoplastic process itself interferes with glucose metabolism, in agreement with the present results. In this respect, hyperglycemic episodes in non-diabetic children with cancer have been shown to result in prolonged hospitalization or even death (21).

Transient hyperglycemia and diabetic ketoacidosis have been shown to be associated with an increased frequency of infections in children undergoing antineoplastic treatment even after the end of treatment (22). These conditions are the result of the damage caused by elevated glucose levels to the mobilization of polymorphonuclear leukocytes, chemotaxis, and phagocytic activity, immunological mechanisms that are compromised by hyperglycemia (23). Taken together, these results suggest that alterations in carbohydrate metabolism may initially arise from the reduced counter regulatory response to insulin caused by neoplastic processes, which are aggravated by treatment. Therefore, glucose monitoring has become more rigorous in patients with cancer (23).

Although insulin and glucose are traditionally measured in blood, we believe that the salivary levels of these substances reflect blood concentrations, since

insulin can be synthesized in extra-pancreatic tissues such as nasal and parotid glands (24) and blood-derived biomolecules and ions contribute to salivary composition (5).

Even some investigators reported that salivary glucose does not serve as an indicator of blood levels (25), we suggest that salivary insulin and glucose reflect plasma variations and can be used as markers to monitor children with cancer, as well as the physiological effects of antineoplastic treatment used in combination with clinical data and other complementary tests.

The present results also showed that salivary IgA concentrations are reduced in children with cancer and this effect persists after six months, that is, antineoplastic treatment does not result in any additional change in the concentration of this immunoglobulin. The variations in IgA levels observed here are similar to those obtained by Souza et al. (4) for patients with cancer using different methods. This difference might be related to the age of the patients and the type of cancer because the two studies evaluated adults and certain types of cancer.

Slow recovery of cellular and humoral immune parameters generally occur after antineoplastic treatments (25) and the finding of reduced IgA levels in the present investigation suggest that other components of the humoral and cellular immunity were affected by treatment, a fact that significantly contributed to immunosuppression. In this respect, 46.8% of the patients showed an unfavorable evolution and died. As the reduction in salivary IgA observed here in patients with cancer occurred before treatment, it seems clear that the presence of cancer itself influenced the decrease in this immunoglobulin. However, investigation of patients over a longer period of time is necessary to determine whether antineoplastic treatment causes additional suppression of salivary IgA.

Considering the presence of immune cells in different tissues and the need to maintain local homeostasis (8), it seems plausible that metabolic, hormonal and immunological changes such as those observed here occur in conditions that cause immune dysfunction (e.g., cancer).

Conclusions

Despite the lack of differences in some biochemical parameters, AP and urea concentrations were found to differ between groups. The results showed effects on thyroid hormone and insulin regulation, particularly after antineoplastic treatment. In addition, a reduction in total IgA was observed even before treatment, an event that is associated with the metabolic and immunological disturbances seen in patients with cancer irrespective of age. Taken together, the results indicate that salivary assessment might be an additional and useful tool for the monitoring children with cancer because biochemical, hormonal and immunological changes driven by cancer processes might be reflected in patients' whole saliva, shedding new light on the potential usefulness of salivary, especially to patients undergoing immunosuppressive therapy like those stud-

ied here. It is important to emphasize that our aim was to evaluate the salivary status of pediatric patients with cancer before and after the antitumor treatment in relation to health children and not to compare serum and salivary data.

References

1. INCA – Instituto Nacional do Cancer. Cancer no Brasil: dados dos registros de base populacional. *Rio de Janeiro*, 2010; Vol. IV. Available at: <http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/> (accessed on 22 May, 2011).
2. Mutti CF, Paula CC, Souto MD. Assistencia a Saude da Crianca com Cancer na Producao Cientifica Brasileira. *Rev Bras Cancer* 2010; **56**: 71–83.
3. Diert RR, Zelikoff JT. Pediatric immune dysfunction and health risks following early-life immune insult. *Curr Pediatr Rev* 2009; **5**: 36–51.
4. Souza RM, Lenh CN, Denardin OVP. Niveis serico e salivar de imunoglobulina a em portadores de cancer de boca e orofaringe. *Rev Assoc Med Bras* 2003; **49**: 40–4.
5. Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med* 1990; **19**: 119–25.
6. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva – A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; **13**: 197–212.
7. Ellison PT, Bribiescas RG, Bentley GR, et al. Population variation in age-related decline in male salivary testosterone. *Hum Reprod* 2001; **17**: 3251–3.
8. Diert RR. Role of developmental immunotoxicity and immune dysfunction in chronic disease and cancer. *Reprod Toxicol* 2011; **31**: 319–26.
9. Johnstone A, Thorpe R. Immunoassays. In: *Immunochemistry in Practice*, 2nd edn, Blackwell Scientific Pub, London, Great Britain, 1988: 859–61.
10. Miachon AAS, Castro AMS, Guerra G Jr. Detection of metabolic syndrome features among childhood cancer survivors: a target to prevent disease. *Vasc Health Risk Manag* 2008; **4**: 825–36.
11. Karjalainen S, Sewon L, Soderling E, et al. Salivary cholesterol of healthy adults in relation to serum cholesterol concentration and oral health. *J Dent Res* 1997; **76**: 1637–43.
12. Lin R, Wang SS, Zhou SY, et al. Analysis of alkaline phosphatase staining results in 238 cases of malignant lymphoma. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003; **23**: 1097–8.
13. Crofton PM, Ahmed SF, Wade JC, et al. Bone turnover and growth during and after continuing chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Res* 2000; **48**: 490–6.
14. Summar ML, Barr F, Dawling S, et al. Unmasked adult-onset urea cycle disorders in the critical care setting. *Crit Care Clin* 2005; **21**: 1–8.
15. van Santen HM, Thonissen NM, De Kraker J, et al. Changes in thyroid hormone state in children receiving chemotherapy. *Clin Endocrinol* 2005; **62**: 250–7.
16. Amer KS. Advances in assessment, diagnosis, and treatment of hyperthyroidism in children. *J Pediatr Nurs* 2005; **20**: 119–26.
17. Yamamori I, Kanie T, Kodera Y, et al. Appearance of thyroid stimulating and blocking immunoglobulins after bone marrow transplant: presentation of two contrasting cases. *Endocrinol J* 2004; **51**: 439–43.
18. Madanat LM, Lahteenmaki PM, Alin J, et al. The natural history of thyroid function abnormalities after treatment for childhood cancer. *Eur J Cancer* 2007; **43**: 1161–70.

6. CONCLUSÕES

- Glicose, uréia, cálcio, IgA total, IgA anti-mutans, IgA anti-insulina e o índice CPO-D foram maiores em pacientes diabéticos.
- Foram relatadas 16 espécies vegetais para tratamento do diabetes, sendo que pata de vaca, azeitona doce, insulina e tamarindo foram as mais utilizadas.
- As espécies vegetais mais frequentemente mencionadas apresentam eficácia cientificamente comprovada como hipoglicemiantes, o que lança novas perspectivas no acompanhamento e no tratamento da diabetes.
- Crianças com neoplasias apresentaram um aumento na fosfatase alcalina, T4, TSH e glicose e uma diminuição de insulina e IgA total.
- A saliva pode ser utilizada para o acompanhamento de pacientes com doenças crônicas hiperglicemiantes como a diabetes em adultos e o câncer em crianças.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HASSAN IA, ABDEL-BARRY JA, MOHAMMEDA ST. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of Citrullus colocynthis fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol** 2000; 71: 325-330.
- ALBRECHT M, BÁNÓCZY J, TAMÁS JRG. Dental and oral symptoms of diabetes mellitus. **Community Dent Oral Epidemiol** 1988;16:378-80.
- AMARAL FMF; RAMOS PGA; FERREIRA SRG. Estudo da Frequência de Cárie e Fatores Associados no Diabetes Mellitus Tipo 1 **Arq Bras Endocrinol Metab** 2006; 50: 515-522.
- AMER KS. Advances in assessment, diagnosis, and treatment of hyperthyroidism in children. **J Pediatr Nurs**, , 2005; 20: 119-126.
- ADA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 2004; 27: S5-S10
- ADA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care** 2012; 35: S11-S63.
- ATKINSON MA, MACLAREN NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. **N Engl J Med** 1994; 331: 1428-1436.
- BAILLARGEON J, LANGEVIN AM, MULLINS J et al. Transient hyperglycemia in Hispanic children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, 2005; 45: 960-963.
- BARBOSA-FILHO JM, MARTINS VKM, RABELO LA, MOURA MD, SILVA MS, CUNHA EVL, SOUZA MFV, ALMEIDA RN, MEDEIROS IA. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. **Rev Bras Farmacogn** 2006; 16: 421-446.
- BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS (2009). Relação nacional de plantas

medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde - Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 132 p.: il. - (Série G. Estatística e Informação em Saúde).

BUTLER SO, BTAICHE IF, ALANIZ C. Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients. **Pharmacotherapy**, 2005; 25: 963-976,.

CARDA C, MOSQUERA-LLOREDA N, SALOM L, GOMEZ DE FERRARIS ME, PEYDRÓ A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2006;11: E309-14.

CARLSSON A, SUNDKVIST G, GROOP L, TUOMI T. Insulin and glucagon secretion in patients with slowly progressing autoimmune diabetes (LADA). **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85: 76-80.

CECHINEL-FILHO V, YUNES RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim nova** 1998; 21: 99-105.

DIETERT RR. Role of developmental immunotoxicity and immune dysfunction in chronic disease and cancer. **Reprod Toxicol**, 2011; 31: 319–326.

ERIKSSON J, FORSÉN B, HÄGGBLUM M, TEPPONEN A-M, GROOP L. Clinical and metabolic characteristics of type 1 and type 2 diabetes: an epidemiological study from the Närpes community in Western Finland. **Diabet Med** 1992; 9:

654-660.

GALARZA OROVIO MC, ROCHA RSS, ROSA OPS. Níveis salivares de estreptococos do grupo *mutans* e de lactobacilos em pacientes portadores de diabetes mellitus insulino-dependente. **Rev Fac Odontol Bauru** 1993;1: 6-12.

GALEA H, AGANOVIC I, AGANOVIC M. The dental caries and periodontal disease experience of patients with early onset insulin dependent diabetes. **Int Dent J** 1986; 36: 219-224.

GOVINDASAMY C, AL-NUMAIR KS, ALSAIF MA, VISWANATHAN KP. Influence of 3-hydroxymethyl xylitol, a novel antidiabetic compound isolated from *Casearia esculenta* (Roxb.) root, on glycoprotein components in streptozotocin-diabetic rats. **J Asian Nat Prod Res** 2011; 13: 700-706.

GRAY AM, FLATT PR . Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). **J Endocrinol** 1999; 160: 409-414.

GROOP L, BOTAZZO GF, DONIACH D. Islet cell antibodies identify latent type 1 diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. **Diabetes** 1986; 35: 237-241.

GROSS JL, SILVEIRO SP, CAMARGO JL, REICHELT AJ, AZEVEDO MJ. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002; 46: 16-26.

GUERRA RNM, OLIVEIRA-JUNIOR JJ, MOUCHREK-FILHO JCE, LIBÉRIO SA, LIMA MVV, PAIM DBS, BRITO CXL, MENDONÇA C, NASCIMENTO FRF; PEREIRA ALA. Salivary evaluation of pediatric patients with cancer, before and after anti antineoplastic treatment. **J Oral Pathol Med** , 2012; 41: 527-553.

HOTHER-NIELSEN O, FABER O, SORENSEN NS, BECK-NIELSEN H. Classification of newly diagnosed diabetic patients as insulin-requiring or non-

insulin-requiring based on clinical and biochemical variables. **Diabetes Care** 1988; 11: 531-537.

HOU CC, LIN SJ, CHENG JT, HSU FL. Antidiabetic dimeric guianolides and a lignan glycoside from *Lactuca indica*. **J Nat Prod** 2003; 66: 625-629.

IMAGAWA A, HANAFUSA T, MIYAGAWA J-I, MATSUZAWA Y FOR THE OSAKA IDDM STUDY GROUP. A novel subtype o type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onse and an absence of diabetes-related antibodies. **N Eng J Med** 2000; 342: 301-307.

INCA- Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 2007

KAUFMAN E, LAMSTER IB. The diagnostic application of saliva- A Review . **Crit Rev Oral Biol** 2002; 13: 197-212.

LEE JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. **Orthod Craniofac Res** 2009; 12: 206-211.

LI WL, ZHENG HC, BUKURU J, De KIMPE N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol** 2004; 92: 1-21.

LIMA DP, DINIZ DG, MOIMAZ SAS, SUMIDA DH, OKAMOTO AC. Saliva: relection of the body. **Int J Infect Dis** 2010;14: 184-188.

LOPEZ ME, COLLOCA ME, PÁEZ RG, SCHALLMACH JN, KOSS MA, CHERVONAGURA A. Salivary Characteristics of Diabetic Children. **Braz Dent J** 2003; 14: 26-31.

MARLES RJ, FARNSWORTH NR. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine** 1995; 2: 137-189.

MEACHAM L. Endocrine late effects of childhood cancer therapy. **Curr Probl P
ediatr Adolesc Health Care**, ,2003; 33: 217-242.

MOURA SAB, MEDEIROS AMC, COSTA FRH, MORAES PH, OLIVEIRA FILHO SA. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão da literatura. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr** 2007; 7: 187-194.

MOHN A, DI MARZIO A, CAPANNA R et al. Persistence of impaired pancreatic beta-cell function in children treated for acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, 2004; 363: 127-128.

NAIR PNR, SCHROEDER HE. Duct associated lymphoid tissue (DALT) of minor salivary gland and mucosal immunity. **Immunology** 1986; 57: 171-180.

NOEL PH, PUGH JA, LARME AC, MARSH G. The use of traditional plant medicines for non-insulin-dependent *Diabetes mellitus* in south Texas. **Phytother Res** 1997; 11: 512-517.

OLIVEIRA JEP. **Diabetes Melito: Quadro Atual no Brasil. Risco Cardiovascular Global 2001**. São Paulo: Lemos Editorial, v. 1, 2001, 47p..

OLIVEIRA JÚNIOR JJ, GUERRA RNM. Biomarcadores imunológicos da saliva. **Rev Ciên Saúde** 2010; 12: 136-145.

PALSAMY P, SUBRAMANIAN S. Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rat. **Chem Biol Interact** 2009; 179: 356-362.

PINK R, SIMEK J, VONDRAKOVA J, FABER E, MICHEL P, PAZDERA J, et al. Saliva as a diagnostic medium. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** 2009; 153:103-110.

RATES SMK. Plants as sources of drugs. **Toxicon** 2001 39: 603 - 613.

ROSA OPS, ROCHA RSS, LOPES ES. Imunoglobulinas salivares e prevalência de cárie em portadores de diabetes mellitus insulino-dependente. **Rev Fac Odontol Bauru** 1993;1:18-21.

SAID O, KHALIL K, FULDER S, AZAIZEH H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel the Golan Heights and the West Bank Region. **J Ethnopharmacol** 2002; 83: 251-265.

SERVICE FJ, RIZZA RA, ZIMMERMAN BR, DYCK PJ, O'BRIEN PC, MELTON III LJ. The classification of diabetes by clinical and C-peptide criteria. A prospective population-based study. **Diabetes Care** 1997;20: 198-201.

SIVIERO-MIACHON AA, SPINOLA-CASTRO AM, GUERRA-JUNIOR G. Detection of metabolic syndrome features among childhood cancer survivors: a target to prevent disease. **Vasc Health Risk Manag**, 2008; 4: 825-836,.

SOUZA RM, LENH CN, DENARDIN OVP. Níveis sérico e salivar de imunoglobulina a em portadores de câncer de boca e orofaringe. **Rev. Assoc. Med. Bras**, 2003; 49: 40-44,.

TENOVUO J, LEHTONEN O-P, VIIKARI J, LARJAVA H, VILJA P, TUOHIMAA P. Immunoglobulins and innate antimicrobial factors in whole saliva of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **J Dent Res** 1986; 65: 62-66.

VAN SANTEN HM, THONISSEN NM, de KRAKER J et al. Changes in thyroid hormone state in children receiving chemotherapy. **Clin Endocrinol**, 2005; 62: 250-257.

VERGE CF, GIANANI R, KAWASAKI E, YU L, PIETROPAOLO M, JACKSON RA et al. Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. **Diabetes**

1996;45:926-33.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva, **World Health Organization**, 1999: 59p.

YAVUZYILMAZ E, YUMAR O, AKDOGANLI T, YAMALIK N, OZER N, ERSOY F, YENIAY I. The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. **Austr Dent J** 1996; 41: 193-197.

YETGIN S, YALÇIN SS, OZBEK N. Clinical value of glycated hemoglobin and fructosamine in the long-term glycemic control of children with acute lymphoblastic leukemia. **Acta Paediatr JPN**, v. 40, n. 1, p. 52-56, 1998.

ANEXO 1
QUESTIONÁRIOS

Ficha nº	Unidade da coleta	
Nome	Data de Nascimento	
Sexo: M () F ()	Tipo De Diabetes	Tipo 1 () Tipo 2 ()
Antecedentes Familiares	() pais () irmãos () avós () tios () primos	
Outras Patologias	() hipertensão () prob. cardíacos () colesterol () prob. renais () tireoide () prob. Respiratórios () outros _____	
Diabético (a) desde:	Atividade Física: () Não () Sim	
Medicamentos Usados:		
Valores glicêmicos (mg/dL)	jejum	pós-prandial
HEMOGRAMA	Hemoglobina	Hematócrito (%)
Glicemia do dia:		
Faz uso de produtos naturais para tratar a diabetes? () sim () não		
Qual a planta ou o produto que usa?		
Faz uso de plantas para outros tratamentos? () sim () não		
Para tratar o que?		
() inflamações () dores () pressão alta () outros _____		
Qual a planta ou o produto que usa?		
Usa que tipo de tratamento natural: () chá () lambedor () unguentos () comprimidos () emplastos () tintura () outros _____		
Onde adquire o produto () feiras () quintal () hortos () vizinhos () farmácias; () mercados () outros _____		
De qual parte vegetal: () folhas () fruto () bulbo () toda a planta () raiz () caule () outro _____		
Como você adquiriu conhecimento dessas plantas para tratamento do diabetes: () Amigos () parentes () outros diabéticos () revistas e TV () profissionais de saúde.		

Questionário Odontológico

Higiene Básica

1. Número de escovações por dia? () 1x () 2x () 3x
2. Uso do fio dental? () não () sim

Acesso a serviços odontológicos

3. Já foi ao dentista alguma vez? () Não () Sim
4. Onde? () Serviço Público () Serviço Privado () Serviço Filantrópico () outros
5. Há quanto tempo? () 1 ano () 2 a 3 anos
6. Recebeu informações de como evitar problemas bucais? () Não () Sim

Quantidade de saliva:

7. Como você descreve a quantidade de saliva na sua boca?
() pouca () normal () muita
8. Tem sensação de seca na boca?
() sim () não

Cárie Dentária

18		28		38		48	
17		27		37		47	
16		26		36		46	
15		25		35		45	
14		24		34		44	
13		23		33		43	
12		22		32		42	
11		21		31		41	

C	P	O	E.I	Total

Nome do entrevistador	
Data do questionário	

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Laboratório de Imunofisiologia

TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO N° _____

Eu, _____ RG. _____, data de nascimento: _____, após ter sido informado sobre os objetivos do trabalho e tomar ciência da metodologia a ser empregada concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de pacientes diabéticos a partir do diagnóstico imunológico e bioquímico da saliva**" a ser realizado sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Rosane Nassar Meireles Guerra e da aluna Mônica Virginia Viégas Lima.

1. **JUSTIFICATIVA DA PESQUISA:** Esse trabalho visa avaliar em pacientes diabéticos as concentrações salivares de IgA e alguns parâmetros bioquímicos como forma de desenvolver metodologia de acompanhamento e diagnóstico da doença, de forma indolor mantendo a mesma acurácia da avaliação sanguínea.

OBJETIVOS DA PESQUISA: a) Determinar a concentração de anticorpos IgA totais, IgA anti-mutans e IgA anti-insulina; b) Determinar a concentração de glicose, proteínas totais, ureia, cálcio e amilase na saliva; c) Fazer um levantamento de quais as plantas são mais utilizadas como hipoglicemiantes, caracterizando o uso dessas plantas pelos pacientes diabéticos; d) Realizar um levantamento epidemiológico da saúde bucal destes pacientes.