

Ana Luísa Moreira Costa

CARACTERIZAÇÃO MULTIPARAMÉTRICA DA SAÚDE ORAL DE UMA AMOSTRA DE CRIANÇAS PORTUGUESAS DIABÉTICAS TIPO I

potenciais determinantes de intervenção preventiva e terapêutica

Dissertação de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária, especialidade de Odontopediatria e Ortodôncia (Odontopediatria)
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra sob orientação do Professor Doutor João Luís Maló de Abreu,
Professor Doutor Manuel Amaro de Matos Santos Rosa e Professor Doutor João Carlos Tomás Ramos

Julho 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Caracterização multiparamétrica da saúde oral de uma amostra de crianças portuguesas diabéticas tipo I

potenciais determinantes de intervenção preventiva e terapêutica

Ana Luísa Moreira Costa

Universidade de Coimbra, 2013

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária, especialidade de Odontopediatria e Ortodôncia (Odontopediatria)

Orientadores

Professor Doutor Manuel Amaro de Matos Santos Rosa

Professor Doutor João Luís Maló de Abreu

Professor Doutor João Carlos Tomás Ramos

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação.

(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art. 108, § único)

A elaboração deste trabalho decorreu em colaboração com:

I. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC):

- a) Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital Pediátrico de Coimbra
- b) Consulta de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-facial

II. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC):

- a) Área de Medicina Dentária
- b) Imunologia
- c) Microbiologia
- d) Laboratório de Bioestatística e Informática Médica

III. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC):

- a) Departamento de Ciências da Vida

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis, *in* "Odes"
Heterónimo de Fernando Pessoa

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos.
À minha madrinha Celeste e restante família.

Partilhamos todos o mesmo fulcro. Sabem quem eu sou, e que serei sempre deles.

Às amigas Ana Calado, Teresa Xavier e Rita Reis.

Há muito que nos mantemos imperturbáveis na partilha de desassossegos e alegrias.

Aos meus restantes amigos.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, onde pude explorar um vasto conjunto de domínios técnicos e científicos tomando clara e fundamentada a minha opção profissional.

À Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, pela utilização do espectrómetro RMN Varian VNMRS 14.1 Tesla adquirido no âmbito do Programa Nacional de Reequipamento Científico, contrato REDE/1517/RMN/2005, com fundos POCI 2010, Fundo Europeu para o Desenvolvimento Regional e Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Agradecimentos

As opções que balizaram o meu trajeto de vida traduzem o culminar de algumas influências que não poderei, de todo, deixar de sublinhar:

Ao Professor Doutor João Luís Maló de Abreu, cujo exemplo pessoal, académico, clínico e de liderança me faz admirá-lo profundamente. A forma como carinhosamente me apelida de “filha” passou a ser, desde o primeiro momento e sem que ele aparentemente perceba, uma condicionante postural que aumenta em mim a responsabilidade de nunca defraudar as suas expectativas. Um agradecimento muito sentido por tudo o que me proporcionou e por me ter feito crescer tanto. Terei para sempre gravados, na minha mente e no meu coração, a intensidade das suas palavras e o brilho dos seus olhos. Não poderia ter tido outro Orientador.

Ao Professor Doutor Manuel Santos Rosa, pela confiança, interesse e incentivo demonstrados desde o início deste projeto. A sua disponibilidade, serenidade, simpatia, capacidade de trabalho e cultura científica incutiram em mim o desejo de melhoria permanente.

Ao Prof. Doutor João Carlos Ramos, mas sobretudo ao colega e amigo João Carlos Ramos. Como alguém dizia um dia “o melhor Médico Dentista português”... O melhor muito para além da inquestionável competência clínica e científica: o melhor amigo, o melhor colega, o melhor pedagogo, um pilar absolutamente decisivo em todo o meu percurso. A intensidade, eloquência, perseverança, sensatez, espírito inovador e apaixonado que transparece em tudo o que concretiza deixa uma marca em todos os que seletivamente se tornam seus amigos e inevitáveis “seguidores” - tenho a sorte de ser um destes. Nunca ninguém me ensinou tanto. A mais ninguém devo tanto.

Ao Prof. Dr. Branquinho de Carvalho, pelo carinho, confiança e palavras sábias e reconfortantes que teve para comigo em todos os momentos.

Aos Prof. Doutores Isabel Poiares Batista, João Miguel Santos, Sérgio Matos, Fernando Guerra e Pedro Nicolau, pela afabilidade e alento permanentes.

A todos os meus restantes Professores, pelo contributo indizível na minha formação humana e profissional, firmando em mim a determinação de cada escolha académica e profissional.

Às Dras. Alice Mirante, Isabel Dinis e Nanci Batista, que na sua consulta de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Pediátrico de Coimbra, e apesar de todas as condicionantes, tão gentilmente me acolheram durante mais de um ano. Este trabalho não teria sido possível sem a sua afetuosa receptividade.

Aos Profs. Doutores Francisco Caramelo, Rui Carvalho e Teresa Gonçalves, pela solicitude e empenho no auxílio técnico-científico, experimental e analítico em todo o desenrolar deste trabalho. Apesar dos enormes afazeres virtude da sua indiscutível competência científica nunca deixaram de prontamente prestar todo o apoio requerido.

Aos Drs. Vera Alves, Branca Silva, Rui Soares e Ludgero Tavares, pela incansável colaboração na receção, preparação e tratamento das amostras.

Aos Drs. Ana Messias, Bruno Freitas e Pedro Cruz, pelo precioso apoio na componente gráfica.

A todos os meus colegas das Unidades Pré-Clínica 3, Clínica 3 e Clínica Integrada de Odontopediatria/Ortodôncia do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, em particular às (também queridas amigas) Dras. Teresa Xavier, Ana Daniela Soares, Sara Rosa e Joana Leonor Pereira, pela compreensão, apoio, carinho e companheirismo. É com muito agrado que cultivo a nossa união e espírito de equipa estando certa que, sem elas, todas as vicissitudes e dificuldades que têm assolado o nosso trajeto se tomariam ainda mais difíceis de ultrapassar.

À Dra. Carina Monteiro, da Assessoria para a Comunicação e Literacia em Saúde da FMUC, pela delicadeza e cuidado com que sempre responde às minhas solicitações.

À Sra. D. Maria de Lurdes Mendes, responsável da biblioteca da Área de Medicina Dentária, pelo pronto e valioso auxílio na pesquisa bibliográfica, bem como simpatia e carinho com que sempre me tratou durante todos estes anos desde os tempos de aluna.

Às Dras. Eva Oliveira, Susana Pereira, Sara Pereira, Anabela Pereira e Assistentes Helena Simões, Alice Ribeiro, Susana Rino, Carla Pereira, Madalena Simões e Marilene Gonçalves, pela amizade, colaboração e tolerância na prática clínica privada, intensa e nem sempre fácil de concretizar.

Ao Dr. José de Oliveira Afonso, pela simpatia, espírito abnegado e absoluta confiança que em mim depositou numa das minhas tarefas profissionais mais motivantes e enriquecedoras no Hospital José Luciano de Castro, em Anadia.

Aos restantes colegas e funcionários da Área de Medicina Dentária da FMUC, pela afabilidade e consideração com que sempre me tratam.

Aos meus alunos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, sem os quais não faria sentido esta vontade contínua de valorização pedagógica, clínica e científica.

A todas as crianças da minha consulta de Odontopediatria e, de forma particular, a todas as que, voluntaria e simpaticamente, integraram esta investigação. São elas os meus principais críticos e avaliadores, mas também as que mais vezes por dia me fazem sorrir.

Ao Manuel António e Vasquinho, pelos marcantes momentos do passado tantas vezes condicionados pela minha dedicação a este trabalho.

A todos os que, mesmo de forma simples e descomprometida, contribuíram para a viabilidade e conclusão deste trabalho, enriquecendo-o com as suas sugestões, comentários e apreciações críticas.

Sumário

I - Enquadramento teórico

1. Escolha do tema
2. Diabetes *mellitus* – considerações gerais
3. Princípios básicos da imunologia oral
4. Diabetes *mellitus* e patologia oral
5. A abordagem da criança diabética na consulta de Medicina Dentária

II - Estudo clínico

1. Introdução e objetivos
2. Materiais e métodos
3. Resultados
4. Discussão
5. Conclusões

III – Perspectivas futuras

IV - Resumo

V - *Abstract*

VI - Bibliografia

VII - Índice

VIII - Anexos

Trabalhos já apresentados no decorrer desta investigação

Poster de investigação: “Caracterização multiparamétrica da saúde oral de uma amostra de crianças portuguesas diabéticas tipo I: potenciais determinantes de intervenção preventiva e terapêutica”. Costa AL, Gonçalves T, Carvalho R, Mirante A, Caramelo F, Ramos JC, Abreu JM, Rosa MS – I Simpósio Inter-Universitário de Investigação em Medicina Dentária – Coimbra, 09 Março 2013;

Poster de investigação: “Identificação de possíveis determinantes na condição periodontal de crianças diabéticas tipo I”. Costa AL, Caramelo F, Ramos JC, Abreu JM, Rosa MS - XXI Congresso Anual da OMD – Porto, 08-10 Novembro 2012;

Poster de investigação: “*Identification of possible determinants in periodontal status of type I diabetic children*”. Costa AL, Silva B, Tavares L, Alves V, Mirante A, Caramelo F, Gonçalves T, Carvalho R, Ramos JC, Abreu JM, Rosa MS - *7th Conference of the European Federation of Periodontology* – Viena de Áustria, 06-09 Junho de 2012;

Poster de investigação: “Caracterização de determinantes na colonização oral por leveduras em crianças diabéticas tipo I”. Ana Luísa Costa, Alice Mirante, João Carlos Ramos, Manuel Santos Rosa, Teresa Gonçalves - XX Congresso Anual da Ordem dos Médicos Dentistas – Lisboa, 10-12 de Novembro 2011;

Poster de investigação: “Caracterização de parâmetros imunoinflamatórios na saliva de crianças diabéticas tipo I e saudáveis”. Ana Luísa Costa, Francisco Caramelo, Vera Alves, João Carlos Ramos, Manuel Santos Rosa - XXXI Congresso Anual da Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária – Coimbra, 21 e 22 de Outubro de 2011;

Poster de investigação: “*Type I diabetic children oral yeast carriage: a question of metabolic control?*” Costa AL, Silva B, Soares R, Mota D, Alves V, Mirante A, Ramos JC, Abreu JM, Rosa MS, Gonçalves T - *29th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Diseases* – Haia, Holanda, 7-11 Junho de 2011;

Poster de revisão: “Metabolómica salivar: relação e utilidade analítica”. Ana Luísa Costa, Ludgero Tavares, João Carlos Ramos, Manuel Santos Rosa, Rui Carvalho - XX Reunião Anual de Medicina Dentária e Estomatologia de Coimbra e I Congresso Internacional de Implantologia de Coimbra - Coimbra, 02-04 Junho de 2011;

Poster de investigação: “Infecção por *Candida* em crianças diabéticas tipo I: para além das manifestações clínicas”. Ana Luísa Costa, Alice Mirante, João Maló de Abreu, Manuel Santos Rosa, Teresa Gonçalves - XVIII Congresso da OMD – Lisboa, 05, 06 e 07 de Novembro de 2009.

Enquadramento teórico

Sumário do Capítulo I

1. Escolha do tema
2. Diabetes *mellitus* – considerações gerais
3. Princípios básicos da imunologia oral
 - 3.1 Caracterização geral dos tipos de imunidade
 - 3.2 Componentes gerais das imunidades inata e adaptativa com influência nas diferentes patologias orais
 - 3.3 Aspectos imunológicos relacionados com as patologias periodontais
 - 3.4 Aspectos imunológicos relacionados com a cárie dentária
 - 3.5 Aspectos imunológicos relacionados com infeções por leveduras do género *Candida*
4. Diabetes *mellitus* e patologia oral
 - 4.1 Diabetes *mellitus* e cárie dentária
 - 4.2 Diabetes *mellitus* e patologia periodontal
 - 4.3 Diabetes *mellitus* e risco de infeções
 - 4.3.1 Colonização por leveduras e diabetes *mellitus*
 - 4.4 Alterações salivares na *diabetes mellitus*
 - 4.5 Outras alterações orais na *diabetes mellitus*
 - 4.5.1 Alteração dos padrões de erupção dentária
 - 4.5.2 Alterações nas glândulas salivares
 - 4.5.3 Halitose
 - 4.5.4 Saburra e outras manifestações linguais
 - 4.5.5 Disgeusia
 - 4.5.6 Síndrome de ardor bucal
 - 4.5.7 Líquen plano e reações liquenóides
 - 4.5.8 Ulcerações e fibromas traumáticos
 - 4.5.9 Alterações pulpares
 - 4.5.10 Outras alterações
5. A abordagem da criança diabética na consulta de Medicina Dentária

I – Enquadramento teórico

I. Escolha do tema

A concepção de que as características do meio oral podem globalmente influenciar uma série de eventos em diferentes órgãos e sistemas reporta-se a Miller (apóstolo de Robert Koch) que, em 1891, na sua publicação “*The human mouth as a focus of infection*”, referenciava a etiologia microbiológica da maior parte das doenças infecciosas, sublinhando ainda o possível papel que os microrganismos da cavidade oral poderiam assumir em diferentes patologias sistémicas ^{1 cit in 2}. Seguiram-se-lhe William Hunter, Rosenow e muitos outros investigadores e clínicos, tornando-se inquestionável a importância de valorizar o corpo humano como um todo, e não como um mero somatório de estruturas anatómicas ².

A relação entre a saúde oral e um conjunto, cada vez mais abrangente, de diferentes patologias sistémicas tem vindo a ser progressivamente reconhecida nas últimas décadas; são exemplos, de entre as mais estudadas, as associações entre patologia oral e patologia cardiovascular, diabetes *mellitus* (DM), prematuridade e baixo peso à nascença, asma e ainda muitas outras hipóteses em estudo ²⁻¹¹. A grande maioria destas associações está comprovada cientificamente, ainda que o nível de evidência disponível até ao momento seja, em alguns casos, manifestamente insuficiente no que respeita ao estabelecimento fundamentado de umnexo de causalidade. Uma conjugação de mecanismos etiologica, biologica e fisiologicamente plausíveis tem vindo a ser apontada e, apesar de várias incertezas, é inegável que esta possível influência oral/sistémica, hipoteticamente bilateral e recíproca, pode assumir um elevado grau de relevância não devendo ser, de todo, ignorada em termos de estratégia global em saúde ^{12, 13}.

A cavidade oral, pelas particularidades que a definem, serve como um “reservatório” contínuo de agentes infecciosos, os quais poderão constituir um fator de risco acrescido na progressão de algumas patologias. Uma das conexões mais estudadas tem sido, de forma particular, a que diz respeito à doença periodontal (DP) com diferentes patologias sistémicas (cardíacas, vasculares, respiratórias, osteoporose, pênfigo vulgar, artrite reumatoide, cancro, DM, risco de prematuridade e baixo peso à nascença, entre outras) ^{7, 14-30}. Da extensamente referenciada relação DM/DP surge alguma evidência apontando uma correlação positiva, não apenas em termos metabólicos, mas também em termos de progressão da DP quando ambas as patologias estão controladas, indicando algum sinergismo entre si ³¹⁻³⁷.

Paralelamente, as manifestações orais podem constituir sinais precoces e/ou importantes de algumas patologias sistémicas assumindo, conseqüentemente, um papel importante no seu diagnóstico conforme ocorre, por exemplo, em determinadas patologias do foro renal e gastrointestinal/inflamatório, nomeadamente a doença de Crohn e a colite ulcerosa ^{38, 39}.

Para além da DP, também a incidência e gravidade da cárie dentária, com eventual incapacidade funcional, têm sido referenciadas, de forma não totalmente unânime, em associação a alguns distúrbios sistémicos. Alguns autores descrevem, apontando múltiplos fatores causais, que a asma, a obesidade e a epilepsia constituem quadros patológicos associados a um risco acrescido de cárie dentária ⁴⁰⁻⁴⁴. Recentemente tem-se questionado se a cárie dentária poderá acarretar igualmente conseqüências para a saúde geral condicionando, por exemplo, os padrões normais de crescimento por incapacidade de ingestão alimentar adequada ⁴⁵⁻⁴⁸.

Apesar de todas estas associações, a maioria decorrente apenas de estudos observacionais, muitos dos mecanismos que lhes estão subjacentes continuam, conforme referido, por esclarecer de forma efetiva; para além da componente estritamente microbiológica, são postuladas diferentes hipóteses que incluem padrões específicos de susceptibilidade genética, acentuação de perfis inflamatórios e infecciosos sistémicos, características relacionadas com a dieta, fatores ambientais, autoimunidade e mimetismo molecular^{8,34}.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a nível mundial mais de 180 milhões de pessoas, crianças incluídas, sofram de DM, com uma expectativa de duplicação nos próximos 20 anos⁴⁹. Relevantes são também os elevados custos, diretos ou indiretos, associados à doença, atribuídos quer aos cuidados exigidos na resolução de situações agudas (hipoglicemia e cetoacidose), quer às complicações mais ou menos debilitantes, microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (acidente vascular cerebral e doença coronária)^{50,51}.

Tendo como ponto de partida a eventualidade desta doença poder afetar, com maior ou menor relevância, o estado de saúde oral, e que muitas das patologias orais são resultado de mecanismos imunoinflamatórios igualmente envolvidos na génese da DM, para além da forte vertente bioquímica e microbiológica, tem-se tornado pertinente caracterizar, tanto quanto possível, esta influência, definindo perfis de risco e formas de atuação clínica em conformidade⁵²⁻⁵⁴.

Em Portugal, e até à data, não foi publicado qualquer estudo retratando especificamente o estado de saúde oral das crianças diabéticas tipo I; a maioria dos dados referentes a esta subpopulação visa, sobretudo, aspectos etiológicos e possíveis complicações da doença em diferentes sistemas/estruturas anatómicas que não a cavidade oral. A pertinência da abordagem do assunto é, também por esta mesma razão, relevante.

Este trabalho está estruturado em duas partes: a primeira abrange uma contextualização teórica do tema; a segunda descreve a componente de investigação realizada. Com o objetivo de assegurar alguma continuidade e adequado enquadramento aos diferentes subcapítulos será ocasionalmente necessária a repetição de determinados assuntos, perspetivados, no entanto, de acordo com a temática especificamente abordada.

2. Diabetes *mellitus* - considerações gerais

Os primeiros conhecimentos relativos à DM são anteriores à era cristã; registos correspondentes ao século XV a.C. já descrevem sintomas característicos da doença mas terá sido apenas no século II que Areteu da Capadócia designou esta patologia de “diabetes”, termo que deriva do Grego (significa “sifão”), atendendo a um dos seus sintomas mais marcantes, a poliúria⁵⁵. Galeno e Avicena referiram-se-lhe com progressiva precisão, cabendo a Thomas Willis, já no século XVII, uma descrição magistral, enfatizando o carácter adocicado da urina, já previamente registado na Índia no ano 500 e atribuindo-lhe, por esta mesma razão, a designação de diabetes *mellitus* (do Latim “mel”) ⁵⁶. Até 1851 o diagnóstico era, desta forma, baseado no “sabor” da urina e apenas em pleno século XX foi possível passar a medir e registar a concentração de glicose sanguínea. A grande mudança relativamente à elevada taxa de mortalidade da doença surgiu com a descoberta da insulina e do papel da mesma na etiopatogenia da diabetes⁵⁷.

A DM constitui, genericamente, um grupo de distúrbios metabólicos caracterizado por hiperglicemia relacionada com uma deficiência na secreção e/ou ação da insulina⁵⁸⁻⁶⁰. O aumento dos níveis de glicose no sangue pode ser resultado de uma deficiência na secreção de insulina por disfunção das células β pancreáticas ou por resistência à ação da mesma a nível hepático e/ou muscular. Estas perturbações estão frequentemente associadas a outro tipo de alterações, nomeadamente a nível do metabolismo lipídico⁶¹. Reconhece-se, atualmente, que estados crónicos de hiperglicemia poderão culminar em danos, a longo prazo, em diferentes estruturas anatómicas (órgãos e sistemas)^{59, 61, 62}.

Estão descritos diferentes fatores implícitos na etiologia da DM, sendo muito importante perceber exatamente qual a fisiopatologia envolvida de modo a instituir as medidas preventivas e terapêuticas mais eficazes⁶¹. Reconhecem-se dois tipos básicos de DM: diabetes *mellitus* tipo 1, muitas vezes designada de insulino dependente (DM tipo 1/DM1/IDDM/T1DM) e diabetes *mellitus* tipo 2, não insulino dependente (DM tipo 2/DM2/NIDDM)^{63, 64}. Estas designações são as mais comumente encontradas na bibliografia médica de referência ainda que, de acordo com Graves, Liu *et al.*, 2006 quer a DM1, quer a DM2, estejam relacionadas com a destruição das células β pancreáticas, resultando numa inadequada produção de insulina; por esta mesma razão os autores consideram não ser adequado manter-se a designação de “diabetes não insulino dependente”⁵². Foi proposta uma subclassificação etiológica da diabetes tipo 1 em tipo IA (em estrita relação com questões imunitárias) e tipo IB (forma idiopática não-autoimune)^{65, 66}.

A DM tipo 2, que representa cerca de 90-95% dos casos, caracteriza-se por diferentes níveis de resistência à insulina e défice na secreção da mesma⁶⁷. Numa fase precoce estes pacientes não necessitam, por norma, de tratamento com insulina para sobreviverem, apresentando algum grau de obesidade; os que não apresentam obesidade pelos critérios normais de Índice de Massa Corporal (IMC) evidenciam, no geral, uma distribuição característica da gordura corporal, com concentração específica na região abdominal. Pauta-se usualmente por uma evolução silenciosa, o que pode conduzir a um diagnóstico tardio e explicar o avanço das complicações macro e microvasculares; está associada a uma forte predisposição genética, complexa e ainda não claramente definida⁶⁷⁻⁷³.

Os outros tipos específicos de diabetes englobam, entre outros, os defeitos genéticos das células β e pâncreas exócrino, da ação da insulina, as endocrinopatias, associação a fármacos, infeções e

condições genéticas sindrômicas^{58,67}. De referir ainda a diabetes gestacional, definida como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou deteção durante a gravidez^{67,68,74}.

A DM tipo I, tema central deste trabalho, é atualmente perspetivada como uma doença crónica imunomediada com um período prodrómico subclínico de duração variável e caracterizada, conforme inicialmente mencionado, pela perda seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina em indivíduos geneticamente suscetíveis, ainda que nem todos estes venham a manifestar clinicamente a doença; uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais parece estar na origem da doença, a qual se torna manifestamente evidente em termos clínicos após a destruição da quase totalidade das células β pancreáticas^{58,68,75-79}. Desta forma é entendida enquanto doença autoimune causada pela infiltração seletiva e destruição das células pancreáticas β produtoras de insulina, com mediação dos linfócitos T CD4+ (LT *helper* ou auxiliares), CD8+ (LT citotóxicos) e macrófagos^{80,81}.

Estudos experimentais na área da diabetes autoimune em modelos animais dão conta da influência marcada das células Th1, e mais concretamente do IFN- γ (interferão gamma), na destruição das células β pancreáticas, como ativadores dos LT CD8+^{82,83}. A taxa de destruição é bastante variável (mais rápida em crianças e mais lenta nos adolescentes e adultos jovens) e, apesar de frequente em faixas etárias mais jovens, pode ocorrer em qualquer idade^{84,85}. Numa pequena minoria dos doentes com DM tipo I não se sabe qual o mecanismo exato de destruição das células β (diabetes idiopática). Este tipo de diabetes tem uma forte componente hereditária e caracteriza-se por uma necessidade de terapêutica insulínica variável^{67,73}.

Foi necessário algum tempo até que fosse valorizado o papel preponderante que os LT CD4+ e CD8+ assumem na autoimunidade da DM tipo I e a disponibilização, na década de 80, do modelo de rato diabético não obeso (*non-obese diabetic* - NOD - *mouse model*) contribuiu, de forma particular, para progressos no esclarecimento da patogénese^{78,86-92}.

Sabe-se que a destruição celular β pancreática mediada por linfócitos T é induzida pela libertação molecular de citocinas e quimiocinas, apesar de muitos dos mecanismos envolvidos permanecerem por clarificar^{78,91,93,94}. O facto de, quer os CD4+, quer os CD8+, serem abundantemente detetados nos infiltrados celulares de insulite na diabetes tipo I torna a sua resposta num potencial marcador autoimune com acentuada relevância clínica^{87,94-98}. A evidência de que um subtipo de células T CD4+ (*Tregs*) inibe ou condiciona a ativação das células T autorreativas (incrementando, desta forma, a auto-tolerância) conduziu a uma das muitas hipóteses formuladas, nomeadamente a de que uma disfunção dos CD4+ supressores, particularmente os que expressam o fator de transcrição FOXP3, pode constituir um ponto subjacente ao desenvolvimento de DM tipo I^{92,99}. Estudos recentes fazem inclusivamente menção a uma proporção variável de *Tregs* em diabéticos tipo I quando em comparação com controlos saudáveis^{92,100-102}.

Por outro lado, e ainda que de reconhecida importância, será manifestamente insuficiente identificar apenas a existência de uma diferença em termos de resposta das células T nas crianças com DM tipo I quando comparadas com crianças saudáveis. Acresce o facto da relatada diminuição significativa de resposta das células T CD8+ após o diagnóstico e o consequente início de terapêutica com recurso a insulina poder ter implicações relevantes nas manifestações pré-clínicas¹⁰³. É de notar, no entanto, que esta alteração das subpopulações linfocitárias não é descrita de forma unânime: Marwaha et al, 2010, por exemplo, reportaram, pelo contrário, um aumento global na proporção dos LT CD4+,

bem como dos CD8⁺ secretores de IL-17 em indivíduos com diagnóstico recente da doença ⁹². Desta forma é aventado que um conhecimento aprofundado dos perfis fenotípicos das células T envolvidas nos processos relacionados com a DM tipo I poderá constituir a chave no desenvolvimento de medidas preventivas inovadoras ^{91,94}.

Recentemente foi demonstrado, também em modelos animais, que os eventos imunitários associados às células Th17 (células T *helper* produtoras de IL-17) podem assumir alguma relevância nos processos de autoimunidade associados à diabetes ¹⁰⁴. A IL-17 é uma citocina proinflamatória segregada por uma linhagem celular distinta de CD4⁺Th17, com papel patogénico estabelecido em diversas perturbações autoimunes; não obstante, a sua relevância na DM tipo I não está inequivocamente demonstrada em casos de diagnósticos recentes ^{91, 92}. Bradshaw *et al.*, 2009 demonstraram que os monócitos dos diabéticos tipo I segregam espontaneamente citocinas proinflamatórias, as quais serão necessárias para a diferenciação e incremento celular de CD4⁺Th17; este facto poderá, porventura, potenciar um desequilíbrio favorecendo a destruição autoimune ^{92, 105}. Face à evidência atualmente disponível deve ser tido em conta, em futuras abordagens terapêuticas, o eventual papel da secreção da IL-17 na patogénese da diabetes autoimune .

A literatura refere basicamente quatro autoanticorpos relacionados com a DM tipo I e com a sua predição clínica: ICA, IAA, GAD65 e IA-2A, cuja deteção está inequivocamente relacionada com o risco de progressão da doença ^{61, 68, 78, 106-108}. Não existe consenso relativo à eventual existência de um tipo específico que despolete o processo, ou qual deles possa ser o responsável; não obstante, tem-se mencionado a ação da proinsulina ou insulina enquanto agente autoantigénico primário, sendo que os IAA e os ICA são, habitualmente, os primeiros autoanticorpos a surgir nas crianças pequenas, ainda em fase pré-clínica. Estão igualmente associados ao haplotipo HLA DR4-DQ8, marcando uma forte susceptibilidade genética à DM tipo I ^{107, 109-112}.

Em paralelo, e na dependência da resposta autoimune, mantêm-se outras linhas de investigação em relação às questões de influência ambiental. A hipótese de que infeções virais, e particularmente pelo género Enterovírus, mas também pelos Rotavírus, Parvovírus e Citomegalovírus, poderiam dar início ou acelerar os processos de autoimunidade relacionados com a DM tipo I carece ainda de evidência consistente ^{68, 113-118}. O mesmo acontece com a composição da flora intestinal, a exposição precoce a leite bovino (em particular relação com um dos seus componentes, a albumina) e ao glúten (proteínas do trigo) que se julga constituírem uma variável importante no desenvolvimento nos fenómenos de autoimunidade relacionados com a DM tipo I ^{68, 119-125}.

Um número alargado de outros constituintes da dieta têm sido conjuntamente estudados, particularmente em modelos animais, no que toca à possível influência no curso da doença, até com eventuais efeitos protetores; constituem exemplos a vitamina D e ω 3, mas mais uma vez carecendo de comprovação em estudos humanos ^{68, 126}.

Em Portugal a DM apresenta uma alta taxa de prevalência: se considerados os indivíduos na designada fase de “pré-diabetes”, cerca de 1/3 (34,9%) da população com idades compreendidas entre os 20-79 anos está afetada, sublinhando-se a estimativa da elevada percentagem de indivíduos com diabetes não diagnosticada (43,6%) ^{127, 128}. Ainda em Portugal, a incidência da DM tipo I nas crianças e nos jovens tem vindo a aumentar significativamente na última década: em 2009 foram detectados 17 novos casos de diabetes por cada 100 000 jovens com idades compreendidas entre os 0-14 anos, o que

corresponde quase ao dobro do registado em 2000 (dinâmica semelhante à verificada no escalão etário dos 0-19 anos) ¹²⁸.

A *American Diabetes Association* faz referência ao facto da grande maioria dos casos de DM tipo I serem diagnosticados em crianças e adolescentes (menores de 18 anos) ^{129, 130}. No entanto, alguns dados indicam que 15-30% da totalidade dos casos diagnosticados ocorrem após os 30 anos de idade ¹³¹. Um aumento desta incidência na relação de variações sazonais tem sido observado em alguns países, com ênfase particular em crianças com idade inferior a 5 anos ^{58, 85, 132, 133}. A maior percentagem dos casos (40-50%) é diagnosticada antes dos 4 anos de idade e 20-30% antes dos 18 anos; os restantes ocorrem na idade adulta ^{134, 135}. No grupo de diagnóstico mais tardio a destruição das células β parece acontecer de forma mais lenta comparativamente ao que é verificado nas crianças, com um início menos abrupto dos sintomas, podendo concluir-se que o ritmo e grau de destruição celular não obedecem a um padrão rígido ⁶¹.

As manifestações clínicas da DM tipo I representam a fase final de insulite estimando-se que, no momento do diagnóstico, apenas 10-40% das células β estejam ainda funcionais ⁷⁵. Em crianças pequenas esta acentuada destruição celular torna-se clara e sintomática em poucos meses, enquanto noutros indivíduos o processo pode arrastar-se durante anos sem que a doença seja expressa, constituindo o surgimento de autoanticorpos, por norma, o primeiro sinal detetável da autoimunidade emergente associada às células β pancreáticas; esta autoimunidade caracteriza-se ainda por ser um processo altamente dinâmico, particularmente durante o primeiro ano de ocorrência ^{78, 112}.

A incidência da DM tipo I sofre uma reconhecida influência geográfica; de acordo com os dados da OMS (*World Health Organization DIAMOND Project Group*), esta incidência é mais baixa na Ásia (ainda que com uma tendência crescente) e América do Sul, ao contrário do que se verifica no continente europeu, em que a incidência, já bastante elevada, exhibe uma marcada orientação de subida ^{136, 137}. A Sardenha e a Finlândia apresentam as taxas de incidência de DM tipo I mais elevadas ¹³⁸. Cumulativamente, 5-10% do número total de casos de diabetes correspondem ao tipo I, com aumento de 2-5%/ano ^{135, 136, 139}.

Outras hipóteses etiológicas com influência no aumento de incidência da DM tipo I nos últimos 30 anos têm sido descritas, e em alguns pontos coincidentes com a questão base da autoimunidade. Estas hipóteses, nem todas suportadas por níveis de evidência científica suficientes para serem consideradas de forma inequívoca, incluem as já referidas questões relacionadas com o desenvolvimento precoce, nomeadamente, exposição ao leite bovino, infeções virais, perda de fatores protetores por insuficiente estimulação imunitária inicial (hipótese "higiénica") e associação a outro tipo de distúrbios autoimunes (asma, por exemplo) ^{57, 61, 113, 124, 138, 140, 141}.

Uma vez que a incidência da DM tipo 2 tem vindo analogamente a aumentar em crianças e adolescentes, torna-se cada vez mais importante distingui-la do tipo I, o que pode ser particularmente difícil no adolescente com excesso de peso, constituindo a caracterização imunológica específica uma mais-valia neste campo. Por outro lado, esta clarificação diagnóstica entre os tipos 1 e 2 torna-se decisiva porquanto apresenta implicações terapêuticas e abordagens educacionais distintas ¹⁴².

Os sinais e sintomas clínicos da diabetes *mellitus* incluem geralmente poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e, eventualmente, choque e cetoacidose de acentuada gravidade, a par de desidratação severa ¹⁴³⁻¹⁴⁶. Estas manifestações são assumidas enquanto resultado da hiperglicemia e do consequente

desequilíbrio osmótico. No caso particular da DM tipo I são, basicamente, quatro as fases que caracterizam o curso da doença: 1) fase pré-clínica (meses ou anos que precedem as manifestações clínicas mas em que já é possível efetuar a deteção de marcadores imunitários e genéticos); 2) fase clínica sintomática; 3) fase de remissão parcial (transitória, com eventual diminuição das necessidades de insulina); 4) fase de dependência crónica de insulina ¹⁴³.

Estão referenciadas cinco complicações major da DM: retinopatia, nefropatia, neuropatia, distúrbios macrovasculares e distúrbios dos processos de cicatrização tecidual, qualquer uma destas em relação direta com a hiperglicemia ¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Mais recentemente a DP foi incluída neste grupo de complicações sendo, inclusivamente, denominada de "6ª complicação da DM" ^{146, 148, 150}. Na base bioquímica dos mecanismos relacionados com estas complicações está a produção, irreversível, de produtos finais de glicosilação avançada (*Advanced Glycation End-products* - AGEs), formados pela glicosilação não enzimática - adição de hexoses a proteínas ou lípidos em condições de hiperglicemia ^{151, 152}. Um estado proinflamatório ligado à ação de diferentes citocinas proinflamatórias [interleucina 1β (IL1β), fator de necrose tumoral α (TNFα) e prostaglandina E2 (PGE2), entre outras] pode ocorrer quando estes produtos se ligam a receptores celulares específicos. A acumulação de AGEs pode igualmente afetar a migração e atividade fagocítica em consequência da oclusão vascular resultante de alterações do endotélio; em cascata uma série de mecanismos envolvendo a regulação/mediação das citocinas culmina com um aumento das suas concentrações e a consequente destruição do tecido conjuntivo ^{146, 148, 153-155}. Por conseguinte, não será difícil perceber o importante papel que todas estas vias podem assumir, por exemplo, na génese da DP; no entanto, paralelamente, a infeção periodontal também pode induzir um efeito em sentido inverso, materializado num estado crónico de resistência à insulina, contribuindo para o ciclo da hiperglicemia e formação de AGEs, amplificando as vias de degradação e destruição do tecido conjuntivo ^{61, 146, 154, 156}.

Há várias décadas que diversas associações internacionais se debatem com a necessidade de definir critérios uniformes para a classificação e diagnóstico da DM ⁷³. Durante muito tempo o diagnóstico assentou puramente nos valores de glicemia (em jejum, ao acaso, ou após uma prova - 75 g - de tolerância à glicose oral). Os valores de corte (*cut off*) empregues no diagnóstico derivam da associação verificada entre os valores de glicemia plasmática em jejum e a presença de complicações microvasculares, nomeadamente a retinopatia ⁶⁷.

Os critérios conhecidos para o diagnóstico de DM incluem, à data: a) glicemia plasmática em jejum (GPJ) ≥ 126 mg/dL (sendo o jejum definido como ausência de ingestão calórica por, pelo menos, 8 horas); b) glicemia plasmática às 2h (GP 2h) ≥ 200 mg/dL na PTGO (prova de tolerância à glicose oral) com 75g (de acordo com a metodologia recomendada pela OMS); c) sintomas clássicos de hiperglicemia acompanhados de glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL ^{73, 142, 157}. Nas crianças, e mais especificamente nas diferentes faixas etárias da infância e adolescência, deve ser tido em conta que estes valores podem variar ligeiramente de acordo com avaliação individual ¹⁴². Importa ainda referir que a DM tipo I pode apresentar-se com sintomas que variam entre a glicosúria inesperada e a cetoacidose, com repercussões que implicam intervenção médica ¹⁵⁸.

São numerosas as proteínas do organismo passíveis de participar em processos de glicosilação. A hemoglobina glicosilada (ou glicada) - HbA_{1c} - é continuamente formada nos eritrócitos como produto da reação não enzimática entre a hemoglobina e a glicose. Esta ligação é altamente estável, pelo que a

hemoglobina permanece glicosilada por um período de tempo correspondente à semivida de um eritrócito (123 ± 23 dias)^{59, 61, 159, 160}. Desta forma, a determinação dos níveis de hemoglobina glicosilada proporciona uma estimativa, ao longo do tempo, da concentração média de glicose sanguínea: valores elevados de HbA_{1c} traduzem elevadas concentrações médias¹⁶¹. Normalmente um valor de HbA_{1c} de 6% é indicativo de que a concentração de glicose no sangue é inferior a 120 mg/dL; se a HbA_{1c} for de 8%, a glicose sanguínea rondará os 180mg/dL, 10% corresponderão a 240 mg/dL e 13% a 330 mg/dL⁵⁹.

A monitorização dos valores da HbA_{1c} tem um acentuado valor clínico uma vez que se assume constituir um reflexo da concentração média da glicose sanguínea nos três meses precedentes estando, por esta mesma razão, analogamente correlacionada com o desenvolvimento das complicações associadas à DM já previamente mencionadas. Trata-se de uma medida que traduz o controlo metabólico da doença, recomendando-se que seja efetuada a sua medição no mínimo duas vezes por ano (para pacientes diabéticos com estrito cumprimento da terapêutica e adequado controlo da doença) ou, idealmente, a cada três meses, para pacientes com alterações recentes da terapêutica ou não controlados metabolicamente^{61, 162, 163}. Contudo, para alguns autores este tipo de medida, apesar de profusamente válida, apresenta ainda assim algumas limitações, não estando totalmente esclarecida a relação entre a HbA_{1c} e as concentrações de glicose¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. A maioria das recomendações advoga a utilização da HbA_{1c} no diagnóstico da DM pela boa correlação com o risco de complicações micro e macrovasculares, sujeição a menor variabilidade biológica ou instabilidade pré-analítica e maior conveniência de aplicação (o seu doseamento não requer nenhum período prévio de jejum); no entanto, o custo de análise, a menor disponibilidade em algumas partes do mundo, a dificuldade de interpretação perante determinadas condições médicas associadas, a correlação incompleta com os valores de glicemia médios e algum grau de insensibilidade diagnóstica constituem reconhecidas limitações^{73, 159, 168}.

Referenciam-se outros métodos analíticos alternativos, embora menos empregues por não possuírem valores padrão que marcadamente permitam balizar os objetivos terapêuticos mas ainda assim passíveis de constituírem marcadores de hiperglicemia, de que são exemplo a quantificação de frutossamina e da albumina glicosilada^{61, 159, 169, 170} *cit in*¹⁶².

Estudos recentes referem que o risco de desenvolver DM acontece mesmo com valores de glicemia considerados “normais”¹⁷¹. A *American Diabetes Association* define, em normas recentes, um intervalo de HbA_{1c} entre 5,7 a 6,4% como categoria de risco acrescido; não obstante, indivíduos com valores inferiores a 5,7% poderão também estar em risco dependendo, não exclusivamente do valor de HbA_{1c}, como também da presença eventual de outros fatores^{67, 73}. A *International Diabetes Federation* e a *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes* recomendam, como referência para o controlo terapêutico em crianças e adolescentes, valores <7,5%, referindo que cada criança deve ter as suas metas individualmente determinadas objectivando ascender a um valor tão próximo do normal quanto possível, evitando-se episódios de hipoglicemia mais ou menos severa^{159, 172}. À medida que se aproxima a idade adulta os valores de referência deverão assemelhar-se aos preconizados para os adultos, reconhecendo-se porém que as alterações hormonais e psicológicas da adolescência podem tornar difícil alcançar esses objetivos, constituindo o grupo etário de mais difícil controlo^{159, 173, 174}. Neste mesmo contexto muitos adolescentes experienciam uma efetiva deterioração no controlo metabólico da DM, maioritariamente atribuível a comportamentos nefastos relacionados com inadequados padrões alimentares, deficiente (ou ausente) prática de exercício físico, não cumprimento da terapêutica e

alterações endócrinas características desta fase, culminando num eventual aumento da resistência à insulina ¹⁷⁵⁻¹⁷⁹.

O controlo dietético, ainda que difícil, revela-se fundamental, porquanto constitui parte integrante da abordagem multidisciplinar da criança diabética; as recomendações, transponíveis às de qualquer criança não diabética, têm por base o equilíbrio alimentar acrescido, na DM, do facto da terapia nutricional, conjugada com outro tipo de cuidados exigidos, poder melhorar aspectos relacionados com o controlo metabólico e, conseqüentemente, com as manifestações clínicas ¹⁸⁰⁻¹⁸³. As recomendações nutricionais na DM tipo I devem centrar-se no atingir de metas de glicose sanguínea desejáveis, sem hipoglicemia excessiva, respeitando ainda níveis adequados de lípidos, tensão arterial e assegurando um normal desenvolvimento da criança. Com o aumento da prevalência da obesidade, para além destas questões nutricionais e dietéticas, o estímulo à prática de exercício físico deve ser constante e parte das estratégias a implementar ^{110, 142, 184-187}.

É importante ter noção que uma monitorização inadequada dos valores de glicemia por um período de 5-7 anos, mesmo durante a infância e adolescência, pode resultar num risco acrescido de desenvolver complicações micro e macrovasculares nos 6-10 anos subsequentes, facto que reforça a importância de ascender, individualmente, a valores de HbA_{1c} adequados e estáveis ^{159, 188, 189}.

Dados do *Epidemiology and Prevention of Diabetes European Project* fazem prever uma preocupante duplicação de novos casos de DM em crianças menores de 5 anos atendendo ao rápido aumento da incidência que tem sido verificado nesta faixa etária ^{133, 190}. A explicação para este fenómeno não foi ainda totalmente apresentada, mantendo-se importante o seu esclarecimento por várias razões: em primeiro lugar, o surgimento da DM tipo I em crianças muito pequenas é frequente e tipicamente associado a uma apresentação sintomática mais aguda, incluindo risco de cetoacidose e necessidade de cuidados hospitalares; por outro lado, estas alterações no padrão da doença poderão significar um aumento no tempo de exposição a episódios de descontrolo metabólico os quais condicionam, conforme já mencionado, o risco de complicações crónicas micro e macrovasculares subsequentes; por último, o acrescido dispêndio económico, que poderá assumir um efeito significativo no custo global dos cuidados de saúde ¹⁹¹.

Uma ressalva importante deve ser feita em relação a estes critérios e métodos de diagnóstico e monitorização da DM: a vasta e frutuosa investigação na área conduz, de forma praticamente contínua, a alterações de normas, valores de referência e condutas terapêuticas. Deste modo, a atualização de conceitos e adequação clínica com base nas mais recentes evidências devem constituir uma preocupação permanente ^{133, 192}.

3. Princípios básicos da imunologia oral

A grande maioria dos antígenos contactam com o sistema imunitário através das superfícies mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital, as quais constituem uma extensa área (cerca de 400m²) de ligação com o ambiente externo e representam a primeira linha de defesa do organismo. Estas “barreiras” enfrentam ambientes ricos em patógenos que desenvolveram mecanismos efetivos para colonização epitelial e invasão das mucosas, mas também antígenos potencialmente prejudiciais presentes, por exemplo, nos alimentos e flora bacteriana comensal exigindo-se, em termos de resposta, uma supressão mais ou menos ativa ^{193, 194}. Sob estas influências as mucosas desenvolveram um sistema imune complexo, anatomico e funcionalmente distinto, capaz de selecionar e adequar o tipo de resposta composto por MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) e passível de subdivisão em diferentes componentes, GALT (*Gut- Associated Lymphoid Tissue*), BALT (*Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*), NALT (*Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue*), glândulas salivares, mamas e órgãos genitourinários ^{193, 194}.

Os tecidos mucosos são altamente povoados pelas células do sistema imune; estima-se que seja o intestino a conter mais células linfóides e a produzir mais anticorpos do que qualquer outro órgão do corpo. Não obstante, as células imunes não são os únicos componentes interventivos na prevenção das infecções, devendo ter-se igualmente em conta, segundo alguns autores, outros mecanismos mecânicos presentes nestas superfícies (barreira celular epitelial e defesas extraepiteliais) que os agentes agressores têm que ser capazes de contornar para acederem às superfícies epiteliais ou penetrarem em profundidade. A barreira epitelial, em particular, constitui um elemento chave atendendo à conjugação das ações química e celular que diferem ligeiramente de um trato para o outro ¹⁹³⁻¹⁹⁵. De forma complementar outro tipo de ações estão descritas, designadamente a ação dos cílios, muco e enzimas bem como, nas defesas extra-epiteliais, a IgAs e IgM, as PRRs (*soluble Pattern Recognition Receptors*), os componentes da cascata do sistema de complemento, a proteína C reativa, os LPS (*Lipopolysaccharide*) e LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*), o CD14+, as citocinas e quimiocinas ^{193, 196 cit in} ¹⁹³.

Para além da função mecânica protetora o epitélio possibilita ao sistema imune um fluxo contínuo de informação acerca do ambiente externo exigindo-se, na indução da tolerância, uma atualização constante nos processos de reconhecimento, processamento e concretização da resposta ^{197 cit in} ¹⁹³.

Os elementos que constituem o MALT podem ser morfológica e funcionalmente subdivididos em duas partes principais: a mucosa organizada associada ao tecido linfóide (folicúlos mucosos nas amígdalas, brônquios e intestinos) responsável pela fase indutora da resposta imune e a mucosa difusa associada ao tecido linfóide (leucócitos generalizados espalhados pelo epitélio e lâmina própria) ^{193, 195, 198}.

O epitélio foi, de uma forma geral e durante várias décadas, encarado apenas como uma barreira passiva contra agentes invasores capaz de, paralelamente, exercer alguma restrição sobre a flora comensal; esta visão, funcionalmente redutora, foi rapidamente abandonada, sabendo-se hoje que o seu papel é extremamente importante no desencadear ativo da resposta imunoinflamatória ^{199, 200}. O epitélio da mucosa oral assume, de forma particular, uma importância inquestionável na defesa do hospedeiro uma vez que determina o primeiro contacto com a maioria dos microrganismos invasores contribuindo

determinantemente para a manutenção de uma homeostasia imunitária através da capacidade de reconhecimento diferenciado e seletivo²⁰¹.

Partindo destes pressupostos abordar-se-ão, de forma resumida, algumas das particularidades da resposta imunoinflamatória com reflexos na cavidade oral.

3.1 Caracterização geral dos tipos de imunidade

O sistema imunitário inclui uma série de componentes cuja atividade primordial assenta na proteção do hospedeiro contra agentes infecciosos. A função imunitária pode ser subdividida em dois tipos de resposta: a inata, inespecífica, que inclui a resposta inflamatória, e a adaptativa, específica, que tende a ser mais eficaz para os agentes patogénicos agressores²⁰²⁻²⁰⁴.

A imunidade inata, presente desde o nascimento, representa uma importante forma de defesa de primeira linha, não reforçada por exposição prévia ou ausência de memória, tendo a vantagem de ser uma resposta rápida (embora, pela inespecificidade característica, possa causar danos nos tecidos do hospedeiro), envolvendo uma série de elementos, celulares e não celulares; as diferentes barreiras físicas - pele e membranas mucosas - representam componentes que os agentes infecciosos terão que transpor para aceder ao hospedeiro^{202, 205}. A ação de "lavagem" de fluidos, tais como lágrimas, saliva, urina e fluido crevicular contribuem para a manutenção de superfícies mucosas livres de microrganismos, para além de conterem agentes bactericidas^{202, 206}.

Na cavidade oral a proteção das estruturas anatómicas contra a infeção é assegurada por uma componente especializada do sistema imunitário - MALT - (já anteriormente referenciado), a qual pode ser encontrada superficialmente em todas as mucosas e concentra cerca de 50% dos linfócitos²⁰⁷. O MALT contém regiões de células T, regiões ricas em células B com elevada frequência de células B IgA positivas (sIgA+) e uma área subepitelial com células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo células dendríticas envolvidas na iniciação de respostas imunes específicas¹⁹⁴.

A resposta do hospedeiro é variável de acordo com os diferentes "microambientes" orais representados pela mucosa oral, glândulas salivares/saliva e sulco gengival/fluido crevicular^{206, 208, 209}. A sua função principal é a produção e secreção de IgA em respostas Th2-dependentes, ainda que possa ter intervenção noutro tipo de respostas, algumas das quais podendo resultando eventualmente em imunotolerância^{210, 211} *cit in*²⁰⁷.

A importância da componente imunitária inata na cavidade oral tem merecido particular atenção²¹². A integridade da barreira epitelial gengival e do epitélio juncional e sulcular previne, por norma, a invasão dos tecidos periodontais por produtos e componentes bacterianos²⁰⁶. Alguns constituintes das paredes epiteliais poderão, inclusivamente, apresentar toxicidade para certos microrganismos; já as secreções salivares, continuamente produzidas e lançadas na cavidade oral proporcionam, entre outros, aglutininas e anticorpos específicos, enquanto o fluido crevicular "fornece" paralelamente componentes serológicos, incluindo sistema do complemento e anticorpos específicos^{202, 213-216}. Todavia, o biofilme bacteriano que coloniza as superfícies dentárias liberta elevadas quantidades de metabolitos que podem, eventualmente, difundir-se através do epitélio juncional (ou de união) e causar danos nos elementos estruturais e celulares do periodonto, com possível invasão dos tecidos moles. De entre as enzimas libertadas pelos microrganismos as proteases são capazes de digerir o colagénio, a

elastina, a fibronectina, a fibrina e outros componentes da matriz intercelular do tecido epitelial e conjuntivo; da estimulação das células do epitélio de união resulta a libertação de vários mediadores inflamatórios incluindo a IL-1, a PGE2, para além das metaloproteínases da matriz (MMP), capazes de transpor a barreira epitelial e atingir o fluido crevicular^{202, 217}.

A microflora colonizadora em permanência do organismo pode funcionar como um eficaz amortecedor contra as infeções uma vez que a competição por nutrientes ou a produção de inibidores compromete o crescimento de outros elementos patogénicos; esta ação é ainda coadjuvada pela intervenção das células fagocíticas, PMN (polimorfonucleares) neutrófilos, monócitos/macrófagos e células NK (*Natural Killer*). Existem ainda os componentes moleculares solúveis, normalmente com funções de proteção, que podem danificar as paredes celulares microbianas, auxiliando nos processos de fagocitose e recrutamento celular, prevenindo ou dificultando a infeção. Incluem-se neste grupo, entre outros, os peptídeos antimicrobianos, citocinas, proteínas de fase aguda, componentes do sistema de complemento e interferões^{202, 218-220}.

A persistência da infeção, apesar das ações de resposta imunitária inata, induz uma resposta imune adaptativa; este tipo de resposta possui características próprias, nomeadamente: especificidade para o agente agressor; memória (o que permite uma ação mais rápida e eficaz perante uma reinfeção ou sempre que o agente agressor seja semelhante a outro previamente reconhecido); diversidade, com capacidade de resposta a uma ampla gama de antígenos diferentes, e distinção ou reconhecimento entre componentes do *self* e *non-self*²⁰².

A resposta imunitária adaptativa pode ser genericamente subdividida em imunidade humoral (mediada por anticorpos) e imunidade celular (mediada por células). Os leucócitos assumem um papel essencial nos mecanismos de defesa, estando envolvidos em diferentes tipos de resposta. Apesar de se poderem distinguir subpopulações distintas de leucócitos, na subdivisão principal reconhecem-se os granulócitos (PMN neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os agranulócitos mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos); os linfócitos podem ainda ser classificados em células B (linfócitos B - LB), T (LT) e células NK. Cada uma destas subpopulações celulares exerce funções definidas e atua nas diferentes fases da resposta inflamatória. De acordo com a expressão antigénica específica (proteínas da superfície celular - CD - *Cluster of Differentiation*), e recorrendo a técnicas de imunocitoquímica, é possível "reconhecer" estes tipos celulares; o LCA (*Leucocyte Common Antigen*) ou CD45+, por exemplo, é um complexo glicoproteico da superfície celular expressado seletivamente por todas as células hematopoiéticas (à exceção dos eritrócitos maduros) sendo considerado um marcador universal de todos os tipos de leucócitos²²¹⁻²²³. Os CD3+ dizem globalmente respeito ao complexo CD3 - células T (LT), os CD4+ aos LT helper/auxiliares/indutores, subconjuntos de monócitos/timócitos e macrófagos, os CD8+ aos LT supressores/citotóxicos e os CD14+ aos monócitos, macrófagos e células de Langerhans, conforme esquema seguinte (Figura 1)²²⁴.

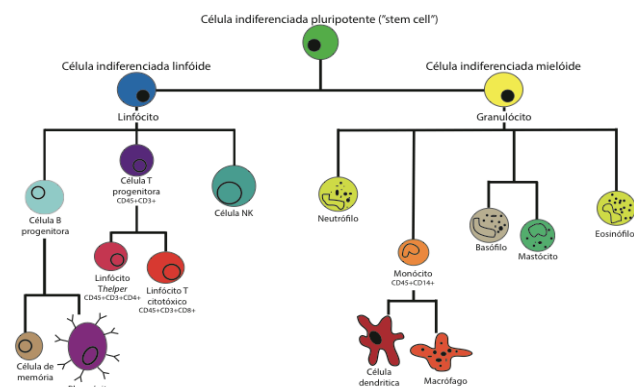


Figura 1. Representação esquemática abreviada de alguns dos diferentes componentes celulares do sistema imunitário (Adaptado de Toddar, 2013 ²²⁵).

3.2 Componentes gerais das imunidades inata e adaptativa com influência nas diferentes patologias orais

A inflamação, aguda ou crónica, inespecífica ou imunomediada, desempenha um papel fundamental nas doenças orais; o tipo de resposta inflamatória do hospedeiro é um fator crítico no desenrolar do processo de doença e, ainda que o principal objetivo seja a proteção e prevenção da invasão bacteriana nos tecidos, também pode tornar-se cronicamente prejudicial e ineficaz conforme se verifica, por exemplo, na DP ²²⁶⁻²²⁸. Um exemplo reside na ação induzida pelos lipopolissacarídeos dos microrganismos Gram- capazes de conduzir, quer a respostas inflamatórias, quer a respostas imunológicas, resultando numa maior libertação de citocinas e mediadores proinflamatórios com prejuízo para o hospedeiro ²⁰².

A saliva contém alguns tipos de componentes não celulares que participam analogamente nos mecanismos de defesa. Os principais componentes do sistema tampão salivar (fosfato, bicarbonato e sialina) asseguram uma função protetora pela manutenção da neutralidade do pH, facto que condiciona o crescimento e colonização por determinados microrganismos ²²⁹. Similarmente um grande número de proteínas assume um papel ativo nos sistemas de defesa salivar, nomeadamente a lisozima, a lactoferrina, a lactoperoxidase, a mieloperoxidase, as diferentes imunoglobulinas (Igs), a aglutinina e as mucinas ²²⁹⁻²³⁵. Outros peptídeos com ação antibacteriana ou antifúngica têm vindo ainda a ser identificados, incluindo histatinas, defensinas e a catelicidina humana LL37 ^{212, 236}. Atendendo ao facto de todas estas proteínas e peptídeos possuírem um amplo espectro antimicrobiano parece existir uma clara sobreposição em termos de funcionalidade, reforçando a ideia que a susceptibilidade para as diferentes patologias orais não estará exclusivamente relacionada com a concentração e/ou atividade de um componente único, não existindo, até ao momento, uma clara explicação para a aparente “redundância” funcional por parte destes componentes do sistema imunitário ^{235, 237}.

Os leucócitos, conforme oportunamente referenciado, são as células fagocíticas predominantes em situações de presença ou ausência de patologia, quer no sangue, quer no sulco gengival ^{238, 239}. Não obstante, os componentes celulares não têm sido, na globalidade, extensamente estudados na saliva, existindo apenas menção à presença de leucócitos derivados das glândulas salivares, fluido crevicular, amígdalas, mucosa oral, secreções bronco-pulmonares e da orofaringe ²⁴⁰. Dos leucócitos salivares, os neutrófilos, representantes do sistema inato, têm sido os mais amplamente abordados; estes

polimorfonucleares, essencialmente provenientes do sangue periférico, migram para a cavidade oral e acedem aos tecidos periodontais através do sulco gengival envolvendo-se em diversos processos de defesa²³⁸⁻²⁴².

De acordo com Van Dyke *et al.*, 1990, alterações sistémicas no número e função dos PMN do sangue periférico podem resultar em transformações orais com algum significado²⁴³. No entanto, os estudos realizados com o objetivo de caracterizar a população de neutrófilos na cavidade oral têm revelado algumas limitações, basicamente atribuídas à dificuldade em obter isolados de neutrófilos salivares "livres" de célula epiteliais, tomando o fluido crevicular preferencial em termos analíticos²³⁸.

3.3 Aspectos imunológicos relacionados com as patologias periodontais

A influência da componente imunitária na gênese das patologias periodontais tem sido muito estudada e será repetidamente mencionada ao longo deste trabalho pela importância que assume.

Na cavidade oral podem ser encontrados PMNs gengivais ou creviculares (do fluido crevicular e que posteriormente migram para a restante cavidade oral) e PMNs salivares propriamente ditos. Enquanto os PMNs creviculares têm sido firmemente associados à patologia periodontal, os PMNs salivares continuam envoltos em alguma controvérsia e desconhecimento, relacionando-se algumas vezes com a ocorrência de gengivite, ainda que a ligação entre a sua concentração e a acentuação clínica de estados inflamatórios gengivais não esteja totalmente esclarecida; da mesma forma, a efetividade dos neutrófilos salivares na proteção da mucosa oral contra infeções mantém-se algo controversa, ponderando-se alguma funcionalidade protetora com reflexos, por exemplo, na patologia periodontal, candidíase oral e lesões ulcerosas^{238, 244-247}. Análises histológicas demonstraram que o infiltrado inflamatório presente nas lesões periodontais consiste em linfócitos e macrófagos: enquanto os LT predominam nas lesões estáveis, a proporção de células B e plasmócitos está aumentada nas lesões ativas²⁴⁸.

Em condições normais não são encontrados na saliva LT citotóxicos da imunidade adaptativa podendo, não obstante, detectar-se células NK e LT CD4+ e LB^{229, 235}. A presença celular na saliva pode, de alguma forma, atuar como marcador biológico; assim, o número de leucócitos salivares tem sido diretamente relacionado com estados de gengivite, enquanto a deficiência específica de PMN na cavidade oral poderá eventualmente predispor a patologia periodontal mais grave, ulcerações e infeções^{229, 240}.

Seymour *et al.*, 1981, num estudo visando a caracterização das subpopulações linfocitárias em crianças com gengivite em dentição temporária constataram que morfologicamente as lesões evidenciavam uma percentagem destacada de linfócitos (LT, sobretudo), seguida de macrófagos e um número reduzido de polimorfonucleares leucócitos e plasmócitos; estes resultados foram parcialmente corroborados por Alcoforado, Kristoffersen *et al.* em 1990^{249, 250}.

A razão celular de LT CD4+/CD8+ é considerada um importante indicador funcional do sistema imunitário^{251, 252}. Os LT CD4+ e CD8+, componentes ativos e preponderantes na imunidade celular, elencam um papel decisivo na imunorregulação uma vez que podem influir, não apenas na resposta celular, mas na gênese da resposta imunitária humoral em reações inflamatórias inespecíficas. Apesar de originalmente apenas a subpopulação CD4+ ter sido considerada como passível de

subdivisão Th1 ou Th2, também nas células efectoras CD8+ podem ser reconhecidos alguns subtipos, nomeadamente T1 ou T2, ou Tc1 e Tc2 ²⁵³⁻²⁵⁵ cit in ²⁵².

A resposta imune adaptativa mediada por células T CD4+ auxiliares efectoras (Th) é mais heterogénea do que a associada aos CD8+ ²⁵⁶. Inicialmente duas formas polarizadas de respostas Th efectoras foram identificadas e designadas por tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), ambas dependentes da ativação de vários fatores de transcrição ^{257, 258}. No tipo Th1 está particularmente envolvido o IFN- γ , com ação principal ao nível da proteção contra microrganismos intracelulares; em oposição, nas respostas do tipo Th2 são produzidas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 responsáveis pela proteção contra nematódos gastrointestinais e alguma relevância nos fenómenos de natureza alérgica ^{259, 260}. A rápida produção de IFN- γ , IFN- α ou IL-12 por parte do sistema inato direciona a diferenciação Th1, enquanto a produção precoce de IL-4, na ausência de IL-12, conduz à diferenciação Th2 ²⁶¹.

Estes mesmos subtipos LT CD4+ e LT CD8+ são frequentemente referenciados na patologia dos tecidos periodontais ^{251, 253-255, 262, 263}. A sua distribuição foi avaliada em indivíduos com manifestações de periodontite rapidamente progressiva (em comparação com indivíduos saudáveis) verificando-se uma baixa na contagem de LT CD8+ na presença de DP ^{264, 265}. No entanto, nem todos os estudos apresentam resultados consensuais, pelo menos no que diz respeito à relação entre a DP e CD4+/CD8+: alguns investigadores referem que este *ratio* diminui em situações de patologia gengival, outros afirmam que o mesmo está aumentado, e outros ainda que não sofre quaisquer variações significativas ^{264, 266-271}. Num estudo mais recente, Demir *et al.*, 2009 avaliaram crianças com gengivite pubertária comparando-as com um grupo controlo de crianças saudáveis; concluíram que as contagens de LT CD4+ e LT CD8+ eram mais reduzidas no grupo que apresentava patologia gengival, estando neste mesmo grupo aumentada a razão CD4+/CD8+. Constataram ainda que após tratamento se verificava alguma tendência de inversão nestes resultados, com uma diminuição da relação CD4+/CD8+, sublinhando o papel significativo que estes componentes poderão, porventura, exibir na patogenia da gengivite pubertária ²⁵².

As concentrações salivares de sCD14 (*soluble* CD14) e mCD14 (*membrane-bound* CD14) podem, da mesma forma, ser hipoteticamente consideradas relevantes na resposta imunitária do hospedeiro, nomeadamente quando ligados às manifestações clínicas da DP ^{224, 272}. Às alterações do colagénio nos tecidos periodontais poderão também ser associados aumentos de CD45+, CD3+ e CD8+ ^{273, 274}.

Em pacientes com inflamação gengival acentuada, correspondente a estados de DP avançada, foram detetados níveis plasmáticos mais elevados de células B produtoras de anticorpos: IgG, IgA e, de forma menos intensa, IgM ^{275, 276} cit in ²⁷⁷.

A incidência e grau de progressão das doenças do periodonto dependem basicamente de interações complexas entre bactérias periodontopatogénicas e o sistema de resposta imunitária do hospedeiro; estas interações são eminentemente mediadas por citocinas e quimiocinas produzidas por diferentes tipos celulares ^{278, 279}. A avaliação do perfil de produção de citocinas é considerada particularmente importante quando está em causa a destruição dos tecidos periodontais ²⁴⁸. Em resposta aos estímulos bacterianos (diretos ou indiretos) verifica-se um aumento do recrutamento e ativação do eixo monócitos/LT, com um aumento similar da libertação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 associados às lesões periodontais; a IL-8, por sua vez, induz a libertação de MMP-8 pelos neutrófilos contribuindo para a

exacerbação da resposta ^{280, 281}. A IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias são relevantes, quer em situações de periodontite, quer na gengivite, não obstante a preponderância ser distinta numa e noutra situação ²⁸². Johnson *et al.* em 2004 referem, a este mesmo propósito, que a concentração de IL-11 e IL-17 varia em consequência do aumento da gravidade das lesões periodontais, de gengivite a periodontite ²⁷⁸.

3.4 Aspectos imunológicos relacionados com a cárie dentária

No que diz respeito à relação entre resposta imunitária e cárie dentária a saliva assume um papel muito substancial uma vez que contribui para a defesa antimicrobiana e controla, de forma decisiva, o equilíbrio entre os processos de remineralização e desmineralização continuamente afetados pelos fatores bacterianos e as proteínas salivares ²⁸³. Bergandi *et al.*, 2007 sugerem que a presença salivar de sCD14, enquanto proteína multifuncional, exhibe uma relação inversa com a presença de lesões de cárie dentária, relação esta não dependente de alterações do fluxo salivar ²⁸⁴. Por esta mesma razão é proposto que a diminuição dos níveis de sCD14 salivar possa ser usada enquanto medida da atividade da cárie dentária, constituindo assim um potencial marcador; porém, mantém-se por esclarecer qual a eventual relação com as lesões iniciais de desmineralização, de diagnóstico muitas vezes difícil ²⁸⁴⁻²⁸⁶.

Num estudo de 2003 realizado numa amostra de crianças indonésias Soet *et al.* encontraram uma associação entre a IgG plasmática e um tipo de proteína de fase aguda (AGP - α 1 glicoproteína ácida) com o número de dentes cariados, perdidos e obturados, referenciando uma possível relação entre a cárie dentária e parâmetros inflamatórios sistémicos ²⁸⁷. Koga-Ito *et al.*, 2002 sugeriram igualmente a existência de uma clara influência da resposta imunitária nos processos relacionados com a cárie dentária apontando os elevados níveis serológicos de IgG em resposta aos *S. mutans* e *Lactobacillus*, culminando numa diminuição da frequência de lesões ²⁸⁸. Esta resposta sistémica do hospedeiro parece ser tão mais evidente quanto mais intensa a progressão das lesões de cárie (fases de envolvimento pulpar) ^{289, 290}. Questiona-se o facto de outro tipo de proteínas de fase aguda ou fatores serológicos (como a proteína C reativa e a neopterina), habitualmente relacionados com processos infecciosos poderem, da mesma forma, exhibir concentrações mais elevadas em indivíduos com cárie dentária severa ²⁹¹.

Tem sido referenciado que a resposta ao *S. mutans* (um dos principais agentes etiológicos da cárie dentária) é do tipo Th1, resultando em elevadas concentrações de IFN- γ , IL-10 e ativação de LT CD8+; já nas lesões pulpares o tipo de resposta será tanto Th1 quanto Th2 ^{292, 293}. Durante as fases de infeção pulpar por cárie parece existir uma regulação acrescida de determinados fatores inflamatórios, de acordo com a informação advinda de estudos de expressão génica ²⁹⁴. Uma vez que nestas situações mais graves de cárie dentária a resposta tipo Th2 pode assumir alguma preponderância é expectável que seja a mesma a determinar o tipo de reação imunitária ²⁹⁵⁻²⁹⁸.

Na modulação da resposta Th1/Th2 o CD14+ (co-receptor para os recetores do tipo Toll - *Toll like receptors* - TLRs) exerce uma função importante uma vez que se une a alguns componentes celulares das membranas bacterianas (lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, por exemplo). de Soet *et al.* sugeriram, em 2008, que a inflamação pulpar eventualmente relacionada com microrganismos Gram + seria inibida por uma acentuada regulação de alguns fatores imunitários incluindo o CD14+ ²⁹¹.

Ao longo de várias décadas numerosos estudos têm tentado demonstrar a viabilidade da imunização, em animais de experiência, com recurso a antigénios derivados dos *S. mutans* e *S. sobrinus* por forma a limitar/inibir a colonização oral e desenvolvimento de cárie dentária; grande parte dos efeitos protetores são atribuídos à ação da IgA salivar, nomeadamente na inibição dos mecanismos relacionados com a metabolização da sacarose²⁹⁹⁻³⁰¹. Estratégias de imunização mucosa têm sido desenvolvidas para induzir níveis elevados de anticorpos salivares os quais, ao persistirem por períodos de tempo mais ou menos prolongados, estabelecem memória imunitária, condicionando episódios de recolonização pelos mesmos microrganismos^{231, 299, 302-305}.

Independentemente do mecanismo pelo qual se estabelece a resposta de proteção imunitária, os avanços nesta área objectivando a aplicação clínica bem sucedida da imunização em humanos implicarão a realização criteriosa de ensaios clínicos com desenho experimental e nível de representatividade adequados, especialmente em grupos de particular elevada susceptibilidade à cárie; não obstante, há que sublinhar que a biologia da cárie é diferente da maioria das infeções agudas, sendo concebível que a eficácia da imunização não seja total (100%), ainda que o impacto da redução potencialmente conseguido se possa refletir positivamente a vários níveis, sociais e económicos inclusivamente^{299, 306, 307}.

3.5 Aspectos imunológicos relacionados com infeções por leveduras do género *Candida*

Com o objetivo de definir a progressão e clarificar quais os componentes moleculares e celulares específicos envolvidos na imunidade à *Candida spp.* foram desenvolvidos alguns modelos animais para estados de candidíase mucosa ou sistémica^{308, 309}. Ambas as componentes, inata e adaptativa, são fundamentais no tipo de resposta imunitária em causa. A componente inata na infeção mucosa envolve vários tipos celulares, nomeadamente neutrófilos, monócitos/macrófagos, células NK, células dendríticas, determinadas células TCD4 β e CD8 β , células T $\gamma\delta$, células epiteliais mucosas, células do estroma e queratinócitos^{310, 311}; uma das funções destas células é propiciar uma via de defesa antifúngica direta, primária, através de fagocitose e secreção de componentes microbicidas. Adicionalmente, a ação da componente adaptativa através de, por exemplo, produção de citocinas proinflamatórias e quimiocinas, favorece a atividade antifúngica^{310, 312}.

A *C. albicans* estimula uma resposta baseada na atividade de anticorpos, não sendo totalmente claro o papel protetor da componente humoral. Autores como Dongar-Bagtzoglou e Fidel, 2005 sugerem que em indivíduos saudáveis é possível verificar alguma ação favorável da IgA, inibindo a colonização por *Candida spp.*³¹⁰. Em relação à IgAs, isótipo mais abundante na saliva, está descrita uma interação específica com manoproteínas da parede celular no contato particular com as espécies deste género (*Candida-specific sIgA*)^{206, 308, 313}. No entanto, esta problemática não está, de todo, esclarecida, uma vez que os pacientes que apresentam uma deficiência seletiva de IgAs parecem não manifestar com maior frequência candidíase oral, conforme seria porventura expectável³¹⁴. Genericamente pode afirmar-se que a maioria dos estudos não identifica o papel protetor dos anticorpos específicos para a *Candida spp.* nas superfícies mucosas em fase de doença manifesta^{308, 310}.

As contribuições relativas de cada um dos componentes, inato e adaptativo, do sistema imunitário parecem atuar de forma “compartimentada”³¹⁵. Enquanto os neutrófilos estão claramente implicados na defesa contra a candidíase sistémica, os LT CD4 β exercem efeitos particulares na candidíase oral (nas mucosas, globalmente) ainda que, também nestes casos, uma resposta efetiva por parte dos neutrófilos seja necessária, mas sob estrita influência dos primeiros^{308, 315-317}

Com alguma semelhança ao que foi descrito na imunopatogénese da DM tipo I, à IL-17, citocina característica das células Th17, é atribuído um papel de mediação na ação conjugada neutrófilos/células T CD4 β ³⁰⁸. Se até há algum tempo atrás se considerava que as respostas protetoras adaptativas contra o género *Candida* eram mediadas por células Th1 efectoras CD4 β , a descoberta das células Th17, integrantes da componente adaptativa, abriu novas perspetivas pelo papel eminentemente regulador que desempenham^{310, 318}. As IL-17 e IL-22 vão influenciar de forma particular, por parte das células epiteliais e do estroma, a produção de citocinas proinamatórias, quimiocinas e proteínas antimicrobianas, as quais atuam sobre as células epiteliais da mucosa e medeiam vários mecanismos de defesa do hospedeiro. Desta forma, pode afirmar-se que as células Th17 (e respetivas citocinas produzidas) servem de elo de ligação entre as respostas de defesa adaptativas e epiteliais; no entanto, é muito importante salientar que o papel protetor/de defesa levado a cabo pelas células Th17 especificamente na cavidade oral em relação à *C. albicans* parece não ser transversalmente aplicável a todas as superfícies mucosas³⁰⁸.

Por outro lado, o reconhecimento da *C. albicans* pelo hospedeiro envolve a cooperação de numerosos padrões de receptores - PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) - expressos pelas células do próprio hospedeiro; destes, dois subgrupos foram especificamente implicados na imunidade antifúngica: os já mencionados TLRs (em particular os TLR2, TLR4, TLR6a e TLR9) e os receptores de lectina tipo C (*C-type Lectin Receptors* – CLRs)^{205, 308, 311, 319-321}.

Os fagócitos constituem, de base, a principal linha de defesa relativamente à colonização e multiplicação de *C. albicans* na cavidade oral²⁴¹. Os efeitos dos PMNs e macrófagos libertados, mesmo em concentrações não muito elevadas, a partir do sulco gengival para a cavidade oral (mais concretamente para a saliva) tornam-se mais marcados perante um incremento na multiplicação de *C. albicans* e de inflamação da mucosa oral^{322, 323}. Indivíduos com comprometimento da função fagocítica poderão exibir maior propensão para colonização por *Candida spp.* e uma das razões parece relacionar-se com a hipótese de existir uma supressão/comprometimento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS - *Reactive Oxygen Species*), cujo papel é essencial na patogénese da infeção^{324, 325}.

De acordo com Ueta *et al.* 1993, e correlacionando esta atividade antifúngica com a capacidade de produção de superóxido, os PMNs dos pacientes diabéticos com candidíase produzem menor quantidade de radicais livres de oxigénio, reduzem a fagocitose e comprometem a destruição intracelular de *Candida spp.*²⁴¹. Desta forma, uma diminuição na fagocitose e quimiotaxia, morte intracelular e atividade bactericida global, advindos particularmente de um descontrolo metabólico da DM, poderão favorecer a infeção, não obstante estes resultados não terem sido corroborados na totalidade das investigações entretanto levadas a cabo^{317, 326-331}.

Também as designadas proteínas do choque térmico (HSP - *Heat Shock Proteins*) poderão exercer algum efeito modulador nas infeções fúngicas, particularmente a HSP90³³²⁻³³⁴.

À infecção por *Candida spp.*, e à já referenciada patogenicidade, poderão também estar associadas outras variáveis: o reconhecimento, a capacidade de ligação à fibronectina e a adesão à parede das células epiteliais, impulsionada por diferentes componentes de superfície das leveduras (de que são exemplo a manose e os receptores C3d), parecem ser passos fundamentais para dar início a todo processo. Paralelamente, poderão ocorrer fenómenos de mimetismo molecular, agravados por situações de hiperglicemia, tornando mais difícil o processo de reconhecimento e comprometendo a eficácia da resposta imunitária³³⁵. Também a ativação do TNF, a ação de endotoxinas, proteínases e a formação de tubo germinativo estão incluídas nestas variáveis³³⁶.

Alguns autores referem, na susceptibilidade a infeções por *Candida spp.*, um eventual efeito advindo da incapacidade de segregação de antigénios ABO ou Lewis, hipótese que continua por clarificar³³⁷⁻³⁴². Estes tipos de antigénios são apontados como receptores de *Candida spp.* nas células epiteliais^{343, 344}. A preponderância das células epiteliais em termos de resposta imunitária tem sido frisada uma vez que, para além da ativação dos LT face à apresentação antigénica, segregam uma grande variedade de citocinas, quimiocinas, defensinas, histatinas e calprotectina com influência local acentuada^{345, 346}.

Resumidamente, ambas as respostas imunitárias estão, de uma forma global, envolvidas na proteção contra a *Candida spp.*: aos macrófagos e granulócitos parece caber a responsabilidade da prevenção da candidíase sistémica, generalizada, enquanto os LT concentram a sua função mais localmente^{313, 347-349}. Relativamente ao envolvimento específico dos LT CD4+ reconhece-se um aumento na contagem e número de células ativadas na presença de infecção, independentemente de alterações no número total, absoluto, das mesmas^{349, 350}. Apesar de sugerida a existência de outras subpopulações celulares cujo papel, em termos de mecanismo de defesa, não deva ser ignorada, a relevância dos LT CD8+ mantém-se controversa, com os resultados a demonstrar alguma disparidade^{308, 350}. A ação da saliva é, com frequência, subvalorizada neste campo: o fluxo salivar limita fisicamente a adesão patogénica, quer à mucosa, quer às superfícies dentárias, sendo igualmente determinante enquanto fonte de IgA e proteínas antimicrobianas^{236, 351, 352}.

O estabelecimento das respostas do tipo de Th1 ou Th2 revela-se determinante na resistência do hospedeiro também neste tipo de infecção; as respostas do tipo Th1 são, por norma, correlacionadas com uma ação protetora, enquanto a progressão da doença se correlaciona com um predomínio de respostas do tipo Th2³⁵³ *cit in* ³¹¹. As células dendríticas fazem a ligação entre a resposta inata e a adaptativa, igualmente dependentes da morfologia assumida por estas espécies: genericamente as células dendríticas, no caso das leveduras, induzem a diferenciação de células T CD4+ via Th1, ao passo que as formas de hifas induzem respostas Th2³⁵⁴.

4. Diabetes *mellitus* e patologia oral

As consequências a longo prazo da DM incluem dano ou disfunção de alguns órgãos e/ou estruturas podendo culminar em complicações crônicas muito específicas. Para além da afeição das funções renal, visual, nervosa, vascular e cardíaca, os períodos mais ou menos prolongados de hiperglicemia repercutem-se, de forma análoga, na incidência de patologia oral ^{62, 355-359}.

Foi a partir dos meados do século XIX que passaram a ser relatadas, com maior consistência, as possíveis complicações na cavidade oral da DM; estas complicações aparentam estar, na grande maioria dos casos, relacionadas com a diabetes não diagnosticada e/ou não metabolicamente controlada, pronunciando-se então com maior rapidez e gravidade ³⁶⁰. De uma forma geral estas manifestações podem subdividir-se em duas categorias, de maior ou menor relevância, conforme se trate de comprometimento dos tecidos duros ou mucosa oral: nas manifestações dos tecidos duros estão basicamente incluídas variações no desenvolvimento e erupção dentária, bem como cárie dentária e patologia periodontal com comprometimento ósseo; já nos tecidos moles da cavidade oral é referida a ocorrência mais acentuada de lesões da mucosa, infeções, síndrome de ardor bucal, alterações de paladar e patologia das glândulas salivares ³⁶¹⁻³⁶⁴.

4.1 Diabetes *mellitus* e cárie dentária

A cárie dentária é uma doença de elevada prevalência que afeta a cavidade oral e que, pelas suas características evolutivas, pode condicionar de forma adversa a saúde geral, com implicações fisiológicas, psicossociais e na qualidade de vida ³⁶⁵⁻³⁶⁷. É a principal causa de dor e perda dentária atingindo transversalmente a quase totalidade dos indivíduos, com determinadas particularidades em termos de raça, género, idade, estrato social e distribuição geográfica ^{366, 368-370}.

Prefigura-se que a cárie dentária, atendendo ao seu carácter cumulativo, acometa entre 60 a 90% das crianças em idade escolar, bem como adultos em larga escala. Apesar de mencionada uma tendência de declínio na maior parte dos países industrializados, dados recentes referem um aumento dos seus índices mesmo em países com resultados favoráveis no controle evolutivo da doença, realçando questões relacionadas com a eficácia na adopção de estratégias preventivas e curativas ^{369, 371, 372}.

Em termos de definição geral pode afirmar-se que a cárie dentária traduz uma destruição dos tecidos dentários susceptíveis em resultado da ação de ácidos provenientes do metabolismo bacteriano, por sua vez dependente da composição dietética, e essencialmente do seu teor em hidratos de carbono (sacarose, em particular). O início do processo, reversível em etapas precoces da evolução, está subordinado à adesão e organização da placa bacteriana à superfície dos tecidos dentários, verificando-se uma certa continuidade nas diferentes fases evolutivas, com gravidade e destruição crescentes: as alterações iniciais no esmalte, clinicamente pouco evidentes, poderão conduzir, mantendo-se desfavoráveis as condições, a envolvimento dentinário, pulpar, periodontal e, em casos extremos, resultar em perda dentária ³⁷³⁻³⁷⁶. Os termos “cáries” e “cárie dentária” são corrente e indevidamente utilizados como sinónimo: a cavidade é uma sequela da doença cárie dentária e um sinal que traduz um estado já avançado de evolução. Na realidade, o que habitualmente é referido como “cáries” não é mais do que

uma “lesão de cárie dentária”, ou seja, uma sequela da doença cárie dentária que já se manifesta clinicamente ^{366, 367, 377}.

Ainda que se trate de uma patologia de origem maioritariamente bacteriana obriga, no entanto, a uma conjugação de fatores durante um determinado período de tempo para que, em situações “críticas”, seja atingida expressão clínica ³⁶⁶. A designação de doença com etiologia multifactorial advém deste mesmo facto, atendendo igualmente a que a simples presença de microrganismos não é, por si só, suficiente para que a mesma se desenvolva ^{283, 373, 378, 379}.

Paul H. Keyes e R. Fitzgerald nas décadas de 40-60 do século passado prestaram um contributo marcante para o esclarecimento desta complexa etiologia evidenciando fatores individuais, microbiológicos e ambientais (em relação particular com a dieta) ^{380, 381} cit in ³⁸². Os agentes etiológicos da cárie dentária podem ser basicamente reunidos em duas categorias principais: os primários ou essenciais, sem a conjugação dos quais não seria possível a ocorrência da doença, e os fatores secundários, de influência variável no aparecimento e evolução das lesões; a interação complexa e dinâmica entre estas duas categorias, numa perspetiva ecológica, determinará a prevalência e a “quantidade” de doença (experiência e risco de cárie) ^{366, 375, 379, 383, 384}.

O processo etiopatogénico resulta de uma perturbação do equilíbrio fisiológico entre os minerais constituintes dos tecidos dentários e o biofilme oral ^{379, 385, 386}. O mecanismo tem por base a atividade de determinadas espécies bacterianas presentes na cavidade oral, particularmente do género *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. sobrinus*) e *Lactobacillus*, não obstante outras espécies poderem estar envolvidas ^{374, 376, 386-389}. Os dentes representam “nichos” particularmente favorecedores de colonização microbiológica uma vez que possuem superfícies não descamativas que permitem a organização do biofilme ³⁶⁶. A produção dos referidos ácidos provenientes do metabolismo bacteriano contribui para uma descida superficial do pH abaixo de valores críticos, podendo resultar em desmineralização dentária ^{373, 376, 390, 391}. A cavitação surge como consequência da manutenção destas condições e da difusão contínua (“perda”) de diferentes componentes estruturais dos tecidos dentários para o meio oral ^{373, 390-393}.

A reversibilidade do processo está dependente da disponibilidade e capacidade de captação de cálcio, fosfato e fluoretos (desejavelmente presentes no meio oral), por parte dos tecidos dentários, com vista à sua remineralização; os fluoretos atuam, neste caso, como agentes catalisadores para a difusão do cálcio e do fosfato, contribuindo de forma decisiva para a remineralização ^{366, 394-396}. Existe, face ao exposto, um permanente compromisso de equilíbrio entre os fenómenos de desmineralização/remineralização: da primazia de um destes resultará, ou uma lesão irreversível, progressivamente cavitada, ou uma reparação estrutural, se revertida a ação nefasta dos diferentes ácidos ^{373, 376, 392, 393, 395, 397}. A remineralização tenderá a prevalecer especialmente se a descida do pH for contrariada e repostada a neutralidade por ação tampão salivar; contudo, caso a progressão da desmineralização culmine na formação de uma cavidade, esta propiciará condições para a criação de um “abrigo” ecológico no qual as bactérias da placa adquirirão capacidade adaptativa a essa progressiva e drástica descida de pH. Parece existir um grau de favorecimento natural da cavidade à organização da placa bacteriana, condicionada pela existência (ou não) de meios de higiene oral eficazes no seu controlo e progressão ^{366, 379, 391-393, 398, 399}.

A grande maioria dos estudos em diabéticos (com a ressalva de muitos dos resultados serem contraditórios), relata alterações das propriedades físico-químicas salivares ou nos componentes com características antimicrobianas (IgA, lactoferrina, lisozima e sistema peroxidase-hipotiocianato, entre outros) com reflexos na incidência de cárie dentária^{235, 283, 393, 400-405}. Estas especificidades potencialmente influentes na saúde oral dos diabéticos serão, pela extensão e importância que assumem, abordadas mais exaustivamente em secção própria (ver I, 4.4).

Para além do papel dos *S. mutans* e *Lactobacillus* na etiologia da cárie dentária, também a *C. albicans* poderá arrogar relevância neste campo, não apenas em crianças, como também em adultos⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. Nas crianças em idade escolar a presença de *C. albicans* parece ter alguma correlação, quer com a prevalência de cárie dentária, quer com o cumprimento de terapêutica antibiótica^{406, 409-415}. A frequência com que é descrita a presença de *Candida spp.* na cavidade oral de crianças, especialmente em lesões de dentina, é elevada (71-97%), enfatizando a questão da efetiva expressão que poderá assumir na etiopatogenia da cárie enquanto componente integrante da flora oral^{416, 417}. O isolamento parece ser mais marcado em indivíduos de alto risco podendo, inclusivamente considerar-se a carga fúngica preditiva relativamente a este risco tendo presente a interação com o *S. mutans*^{415, 418-421}. De acordo com Sziegleit *et al.*, 1999 e corroborado por alguns outros autores, as lesões de cárie, sobretudo em dentina podem, inclusivamente, servir também como “reservatórios” de *Candida spp.*, com uma participação decisiva nas reinfeções^{388, 418, 422}. De qualquer modo, o contributo da *C. albicans* no desenvolvimento da cárie dentária deve ser tido em conta de forma relativa face ao conjunto de microrganismos cariogénicos que integram a flora oral. A este propósito Marchant *et al.*, em 2001 referem, num estudo visando a caracterização microbiológica de 52 lesões de cárie em dentes temporários que, enquanto os *S. mutans* correspondiam a 6,0% e os *Lactobacillus* a 1,3%, a *C. albicans* representavam apenas 0,2% da totalidade da flora cultivável, mesmo tendo em consideração tratar-se da espécie de maior “biomassa”⁴¹⁶.

Relativamente às propriedades cariogénicas adicionalmente atribuídas à *Candida spp.* são mencionadas a adesão específica à interface saliva - hidroxiapatite, ao colagénio e alguma capacidade de dissolução da hidroxiapatite^{420, 423, 424}.

A produção de metabolitos ácidos e o tempo de atuação dos mesmos, não apenas pelas espécies habitualmente envolvidas na etiopatogenia da cárie dentária, mas também pelas diferentes espécies do género *Candida*, poderão contribuir para a criação/manutenção de um meio oral com baixo pH, favorecedor do processo de desmineralização do esmalte^{388, 419, 421, 425, 426}. Existe ainda alusão ao facto de, em condições de baixo pH e elevada concentração de hidratos de carbono, a sua capacidade de adesão poder estar significativamente aumentada, a par da sua multiplicação, contribuindo para um aumento definido de patogenicidade por ação citotóxica direta da resposta inflamatória do hospedeiro^{351, 427-430}.

Desta ligação das espécies de *Candida* ao pH salivar destaca-se, para além do favorecimento da sua multiplicação na presença de valores de pH mais baixos, a eventual competição com outras espécies, particularmente do género *Lactobacillus*^{388, 431-433}. Contudo, a correlação *Candida spp./pH* salivar não pode ser estabelecida de forma linear, tendo presente a complexidade do processo de formação de ácidos pelas leveduras³⁸⁸. Se no caso dos *Lactobacillus* a carga acídica está baseada na secreção de ácido láctico, já nas leveduras os processos que contribuem para a acidificação do meio envolvente englobam a

participação de outros componentes orgânicos, incluindo o piruvato e o acetato, detectados em meios salivares ricos em glicose^{388, 429}. Em todas estas reações a disponibilidade de hidratos de carbono passíveis de metabolização atua de forma determinante na competição entre os diferentes microrganismos. Um dos estudos que menciona esta questão é o de Karjalainen *et al.*, 1997, no qual se verificou que a presença de leveduras na saliva estaria altamente associada com a DM, nomeadamente nos casos de inadequado controlo metabólico, enquanto a contagem de *Lactobacillus* não estaria, por sua vez, dependente dos valores da glicemia⁴²⁷.

Deve ser feita uma referência particular às crianças de menor idade, dado que em fase de dentição temporária as lesões de cárie podem apresentar um padrão especialmente agressivo, com localização preferencial nos incisivos maxilares, envolvendo de forma complementar molares maxilares, mandibulares e, progressivamente, todas as peças dentárias – cárie precoce da infância (“*early childhood caries*”) ⁴³⁴⁻⁴³⁶. A colonização bacteriana precoce, a amamentação prolongada, os hábitos de sucção nutritivos noturnos (especialmente com substâncias açucaradas), defeitos de esmalte, inadequado aporte de fluoretos, cuidados de higiene deficitários, alterações sistémicas e condição socioeconómica são alguns dos fatores etiológicos hipoteticamente relacionados ^{434, 436-441}. É neste contexto que se introduzem conceitos como janela de infetividade e transmissão vertical e horizontal de cárie dentária ^{231, 442-446}.

Atualmente a avaliação individual do risco de cárie assenta na premissa de que os fatores de risco são mutáveis com o tempo e as circunstâncias ⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹. Desta forma, e no seguimento do princípio que define a cárie dentária como patologia de etiologia multifatorial, pode perceber-se que nestes fatores de risco físicos e biológicos a valorizar podem incluir-se alterações salivares (composição e fluxo), elevada concentração bacteriana, desajustada exposição a fluoretos, particularidades anatómicas, genéticas, imunológicas, relacionadas com estilos de vida, fatores comportamentais e necessidade de cuidados de saúde especiais ^{366, 379, 448-451}. São ainda de sublinhar outros agentes passíveis de contribuir para o surgimento ou agravamento clínico das lesões; assim, ao incremento do risco de cárie podem ainda estar associados a debilidade económica e social (minorias étnicas, baixo nível cultural/educacional), limitações no acesso a cuidados de saúde oral (incluindo práticas preventivas), experiência prévia de cárie, reabilitação com recurso a dispositivos ortodônticos/protéticos desajustados ou incorretamente concebidos e higienizados, distúrbios de desenvolvimento e coexistência de determinadas patologias e terapêuticas sistémicas e/ou crónicas ^{358, 366, 372, 383, 384, 448, 452-455}.

Apesar do referenciado decréscimo global de prevalência e gravidade das lesões de cárie na dentição permanente a sua ocorrência não deixa, contudo, de constituir ainda um grave problema em termos de saúde pública ^{456, 457}. Também o grau de progressão da doença tem vindo a diminuir com a idade, atingindo tendencialmente diferentes superfícies dentárias, sendo as lesões oclusais extensas, por exemplo, mais características nas crianças; não obstante, na dentição temporária quando considerados determinados grupos populacionais específicos não é verificada esta tendência, constatando-se não apenas uma estabilização mas, inclusivamente, algum incremento, quer na prevalência, quer na severidade das lesões ^{371, 458-460}. Mesmo atendendo a todas estas constatações mantêm-se disparidades que condicionam, a vários níveis, os padrões de desenvolvimento de cárie dentária. Apesar de contestado, alguns autores referem que estas disparidades podem ser explicadas por uma tendência de “polarização”, em que uma pequena percentagem da população concentrará a maior parte da doença (80% da experiência de cárie centrada em 20% da população) ^{461, 462}.

É igualmente importante ter em conta que na avaliação da cárie dentária não devem apenas ser relevados aspectos etiológicos e/ou de avaliação do risco, mas também algumas questões relativas às metodologias de diagnóstico: possíveis comparações que envolvam dados globais relativos à frequência e distribuição da doença poderão ser dificultadas por diferentes critérios de diagnóstico e condições de observação ou registo influenciando, de forma óbvia, na avaliação da prevalência e incidência. A fiabilidade e reprodutibilidade do diagnóstico têm constituído uma reconhecida dificuldade clínica, obrigando a múltiplas abordagens no sentido de reconhecer as distintas fases do processo: desde pequenas lesões iniciais, alterações evidentes de cor e/ou estrutura, até diferentes graus de cavitação^{463, 464}.

A deteção clínica dos diferentes estádios das lesões através do exame visual de todas as superfícies dentárias implica um grau de objetividade cujo desígnio último reside em determinar se a doença está ou não presente, independentemente da gravidade. A observação de lesões na superfície oclusal estará, à partida, facilitada pela maior facilidade de observação direta; já em relação às superfícies interproximais sabe-se que a avaliação convencional através de exame visual, mesmo que complementado com eventual registo radiográfico, fica porém muito aquém do que seria desejável dado uma grande parte das lesões poder permanecer por diagnosticar. A consequência destes “erros” de diagnóstico influirá decisivamente na estratégia adotada em termos de abordagem preventiva e terapêutica, reconhecendo-se a necessidade de desenvolver meios de diagnóstico alternativos/complementares de elevada especificidade^{366, 465-469}.

Diferentes sistemas, utilizando diferentes definições de cárie dentária, limiares de deteção, estádios das lesões e condições de análise conduzem ainda a dificuldades na comparação de resultados obtidos⁴⁷⁰⁻⁴⁷². A sensibilidade e especificidade na deteção e registo das lesões estão diretamente relacionadas com a metodologia adotada. O registo tradicional, em levantamentos epidemiológicos preconizado pela OMS, de lesões apenas já em fase de cavitação (cl clinicamente evidente), conduz a uma subvalorização da doença porquanto desta forma muitos indivíduos considerados isentos de cárie apresentam na realidade lesões da doença, ainda que em fases precoces de evolução (“*no obvious decay*”)^{366, 473, 474}.

O *International Caries Detection and Assessment System* ICDAS (-II) foi desenvolvido tendo por base sistemas de diagnóstico previamente aplicados, numa tentativa de solucionar a disparidade entre os mesmos. Os critérios utilizados tomam-no, de acordo com alguns autores, um sistema cuja fiabilidade, reprodutibilidade e validade, em dentes temporários ou dentes permanentes, têm contribuído para que seja crescentemente adoptado nos domínios da investigação epidemiológica, prática clínica e ensino, estando a sua aplicação descrita em estudos recentes^{463, 475-490}. A inclusão, neste sistema de diagnóstico, de lesões de cárie em qualquer fase de desenvolvimento, incluindo as mais precoces (ainda sem perda estrutural acentuada), imprime melhorias no grau de sensibilidade, sobretudo em populações com baixa prevalência de cárie, com uma tendência de evolução mais lenta e passíveis de abordagens minimamente invasivas^{479, 482}.

Para a caracterização quantitativa da cárie dentária têm sido utilizados, de acordo com as recomendações da OMS, os índices CPO e cpo, de aplicação válida para ambas as dentições, permanente e temporária respetivamente; estes índices consideram o número de dentes cariados, perdidos e obturados (restaurados) aludindo à experiência passada de cárie de um indivíduo, grupo de indivíduos (neste caso, CPO de grupo) ou superfícies dentárias enquanto unidade de registo (CPOs)⁴⁷⁴.

^{491, 492, 493} *cit in* ⁴⁸¹. Apesar de continuarem a ser corretamente aplicados na realização de levantamentos epidemiológicos (sobretudo no que diz respeito a estudos de prevalência) estes índices apresentam algumas limitações, sendo criticado o seu emprego e interpretação atendendo a fatores tão diferentes quanto, a título de exemplo: critérios de registo pouco fiáveis; causa da perda dos dentes ausentes de difícil confirmação; lesões de esmalte não registadas, bem como as de dentina não cavitadas (“sombras na dentina”); não permitem a determinação da atividade da doença e atribuem a mesma ponderação a diferentes estados (perda/restauração/cárie) ^{481, 494}. Desta forma, outros tipos de índices têm sido propostos como alternativa ou, inclusivamente, complemento para a caracterização da cárie dentária ^{491, 495-497}.

Importa também fazer referência ao índice SiC (*Significant Caries Index*), indicador que traduz o CPO médio da terça parte da população em estudo mais atingida pela doença, permitindo evidenciar um subgrupo de maior prevalência e, hipoteticamente, de maior risco ou suscetibilidade ⁴⁹⁸⁻⁵⁰². Não obstante, verifica-se uma ausência de consenso na implementação de estratégias preventivas visando unicamente indivíduos classificados como de “alto risco”, questionando-se inclusivamente o custo-benefício das mesmas ⁵⁰³⁻⁵⁰⁵.

Na prática clínica o tratamento da cárie dentária com recurso a técnicas restauradoras continua a ser o método mais aplicado; porém, em alguns países (escandinavos por exemplo) esta tendência tem vindo a ser modificada, apostando-se em abordagens mais conservadoras ⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁸. Contemplando o facto da incidência poder variar acentuadamente de indivíduo para indivíduo, de grupo para grupo ou região geográfica, é atualmente consensual a necessidade de encarar como prioritária a prevenção nos seus diferentes níveis; desta forma, apesar das crianças serem o alvo preferencial dos cuidados preventivos, estes devem ser mantidos, idealmente, por toda a vida, evitando eventuais lesões tardias ou recorrências ^{365, 366, 509, 510}. Nesta mesma linha de pensamento conservador em muito baseada em cuidados antecipatórios, e independentemente do modelo de diagnóstico adoptado, as orientações internacionais sublinham a tendência de abandono do modelo “cirúrgico” (excisão/substituição do(s) tecido(s) afetados), para dar lugar a uma abordagem preventiva, conservadora e minimamente invasiva, visando o controlo do início e progressão da doença ^{365, 511, 512}. Subsequentemente, e de acordo com o previamente referido, a ênfase deverá ser colocada no diagnóstico precoce, bem como na avaliação da atividade e risco de cárie, permanentemente revistos e atualizados ^{451, 513, 514}.

No início da segunda metade do século XX novas descobertas permitiram uma melhor compreensão dos processos envolvidos na etiologia e dinâmica da cárie dentária, a par das potencialidades cariostáticas do flúor; conseqüentemente, começaram a surgir programas preventivos objetivando, não apenas o surgimento das lesões, mas também o tendencial agravamento das mesmas. Assim, incluídas nestes programas passaram a estar medidas tão diversas quanto a fluoretação das águas de consumo (e outros: leite, sal), reforço da importância da higiene oral e controlo de hábitos alimentares ⁵¹⁵⁻⁵¹⁸. Algumas intervenções alternativas têm surgido de forma a complementar este objetivo preventivo, nomeadamente a aplicação de selantes de fissuras e a utilização de agentes antimicrobianos e/ou com capacidade remineralizadora ^{393, 519-525}.

A despeito da inquestionável utilidade de todas estas medidas deve sublinhar-se a utilização generalizada, massificada, das pastas dentífricas fluoretadas, medida que face à evidência disponível maior impacto causou (e causa) no controlo da cárie dentária, tal como a aplicação de geles e vernizes de flúor,

sobretudo no que diz respeito à dentição permanente, escasseando os dados relativamente à dentição temporária⁵²⁶⁻⁵²⁹. Apenas uma nota para a aplicação de selantes de fissuras a qual, adotada com uma base sustentada na avaliação da susceptibilidade à doença, apresenta resultados favoráveis enquanto medida integrada num conjunto de ações preventivas, individuais ou comunitárias⁵³⁰⁻⁵³².

Relativamente à eventual relação entre a DM e um risco aumentado de desenvolver cárie dentária, esta não está inteiramente reconhecida uma vez que os resultados de alguns dos estudos em que são comparados indivíduos diabéticos e indivíduos saudáveis não são concordantes: alguns constataram um aumento deste risco (traduzido por uma maior prevalência), enquanto outros, ou não verificaram qualquer relação significativa, ou relataram inclusivamente uma diminuição desse mesmo risco^{11, 62, 427, 533-548}.

De uma forma mais concreta tem sido investigada a possível influência do equilíbrio metabólico da DM; de acordo com a maioria das referências publicadas esta influência, a existir, traduzir-se-á negativamente (com acréscimo de lesões) perante um inadequado controlo metabólico da doença^{63, 358, 427, 536, 549-558}. Iughetti *et al.*, 1999 referem que poderá existir inclusivamente menor risco de cárie dentária, relativamente a crianças saudáveis, em crianças com a doença metabolicamente controlada⁵⁵⁴. No que se refere à duração da DM, também esta variável pode revelar-se uma condicionante, com algumas referências a apontarem para um possível agravamento do risco de cárie perante uma maior duração da doença^{358, 559}.

Em dois estudos realizados recentemente foi possível verificar que: a) em adolescentes diabéticos tipo I um inadequado controlo metabólico e o surgimento precoce de lesões contribuirão hipoteticamente para um aumento do risco de desenvolver mais acentuadamente a doença, não obstante uma correta higiene oral e uma normalização do controlo metabólico poderem, aparentemente, prevenir esta ocorrência e gravidade⁵⁵⁷; b) num grupo de crianças (3-16 anos) não se encontrou diferença significativa no que respeita à experiência de cárie quando se compararam diabéticos tipo I e controlos saudáveis, embora se tenha verificado nas primeiras um nível elevado de lesões ativas, refletindo um baixo nível de cuidados médico-dentários⁵³⁵.

Twetman, Aronsson e Björkman em 1989 estudaram a distribuição na saliva dos principais agentes cariogénicos (*S. mutans* e *Lactobacillus*) num grupo de crianças com DM tipo I em comparação com um grupo controlo de crianças saudáveis estabelecendo, adicionalmente, uma relação com o controlo metabólico da doença; dos resultados obtidos destaca-se o facto de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo relativamente aos *S. mutans*, o mesmo não acontecendo em relação aos *Lactobacillus*, menos prevalentes nas crianças diabéticas e positivamente relacionados com a concentração de glicose salivar. Concentrações elevadas de glicose salivar, independentemente do padrão dietético, poderão promover a ação de bactérias cariogénicas, sobretudo em casos de diminuição do fluxo salivar; não obstante, não é ainda possível, com base nos dados disponíveis, estabelecer qualquer relação estrita com o controlo metabólico da doença (dose de insulina ou percentagem de hemoglobina glicosilada no sangue)⁵³⁷. Globalmente, os estudos que têm avaliado a concentração bacteriana salivar em indivíduos diabéticos, a possível relação com a incidência de lesões de cárie e os mecanismos metabólicos inerentes à DM têm referido resultados contraditórios^{547, 549, 558, 560, 561}.

Ainda em relação ao conteúdo dietético das crianças diabéticas, apesar deste ser, obrigatoriamente e na essência, menos abundante em hidratos de carbono, o elevado número de refeições ingeridas de forma fracionada pode aumentar o risco de cárie (no caso de prevalecerem, de forma não balanceada, os processos de desmineralização na superfície do esmalte); acentua-se igualmente a relevância dos mecanismos compensatórios da saliva sobre os efeitos negativos que um possível aumento da concentração da glicose salivar e crevicular, particularmente em diabéticos com elevados valores de HbA_{1c}, podem representar^{427, 533, 549, 553, 554, 562-565}. A restrição inerente ao consumo de sacarose tomar-se-ia, à partida, desfavorável para a proliferação de microrganismos cariogénicos, condicionando o surgimento e evolução de lesões de cárie; porém, esta relação causa-efeito não foi ainda direta, linear e incontestavelmente verificada^{545, 557, 566}.

Por outro lado deve destacar-se a questão comportamental, descrita não apenas em relação às crianças diabéticas, mas transversal a todas as que padecem de patologias crónicas (como a asma, patologia cardíaca ou fibrose quística, por exemplo), nomeadamente uma tendencial sobre-proteção parental, o que poderá determinar um acréscimo no nível de cuidados preventivos gerais, inclusivamente uma melhoria global do nível de saúde oral das mesmas⁵⁶⁷⁻⁵⁶⁹.

4.2 Diabetes *mellitus* e patologia periodontal

As doenças periodontais (DP) são das mais comuns em toda a população e, classicamente, de forma generalista, referem-se a estados patológicos de periodontite e gengivite, ainda que existam alguns subtipos distintos destas duas entidades. Fatores como a idade em que surgem os sinais e sintomas, a aparência clínica, o grau de progressão, a patogenicidade dos agentes envolvidos e a influência de eventuais patologias sistémicas contribuem para a sua caracterização particular^{252, 570, 571}.

Em crianças e adolescentes as DP podem ser especificamente agrupadas em diferentes entidades, desde a “simples” gengivite a formas agressivas e precoces de periodontite, associadas ou não a patologias sistémicas, sendo a forma mais comum a gengivite pubertária⁵⁷²⁻⁵⁷⁵.

Enquanto a gengivite diz respeito a estados de inflamação dos tecidos gengivais sem perda de suporte periodontal, a periodontite, de mais rara ocorrência em crianças, é definida como um estado inflamatório dos tecidos de suporte dentário, sob influência específica de uma ou mais espécies de microrganismos, resultando na progressiva destruição do ligamento periodontal e osso de suporte, com recessão gengival e formação de bolsas periodontais^{572, 575-577}. A gengivite, praticamente “universal” em crianças e adolescentes pode, no que respeita à gravidade, apresentar fases progressivas, devendo atender-se a que grande parte das lesões gengivais, apesar de persistentes, podem não ser evolutivas⁵⁷². Um estudo publicado em 2007 visando uma amostra de crianças portuguesas com idades compreendidas entre os 6 e os 15 anos de idade revelou que 88% das mesmas manifestavam sinais de gengivite, número bastante revelador da sua elevada frequência⁵⁷⁸.

Apesar de uma definição relativamente simples, a patogénese da DP reveste-se de acentuada complexidade, refletindo a conjugação de múltiplos fatores relativos ao início e manutenção de um processo inflamatório crónico para o qual contribui significativamente a diversidade da microflora oral e dos seus inúmeros subprodutos^{579, 580}. A resposta imunitária subsequente medeia uma cascata de eventos que condicionam, em parte, uma destruição tecidual potencialmente grave^{202, 581, 582}. A este

propósito sabe-se, por exemplo, que para além do papel assumido pelos neutrófilos enquanto primeira linha de defesa contra agentes invasores, os mesmos poderão ter efeitos relativos à mediação da destruição celular em diferentes patologias inflamatórias; no caso das patologias periodontais parece verificar-se, entre algumas outras alterações, um aumento do número e estado de ativação dos neutrófilos em circulação com libertação de oxidantes citotóxicos e enzimas proteolíticas, resultando no referido comprometimento tecidual ^{7, 583, 584}.

De acordo com os conceitos atuais da etiologia multifactorial da DP, e apesar de um modelo etiopatogénico único não ter sido até ao momento validado, é amplamente aceite que a mesma resulta da ação do biofilme bacteriano no periodonto de indivíduos susceptíveis ⁷⁶. As bactérias parecem atuar diretamente nos primeiros momentos da infeção; contudo, a maior parte dos seus efeitos é sentida de forma indireta através dos componentes celulares e humorais da resposta específica e inespecífica do hospedeiro ⁵⁸⁵. Tendo por base uma revisão realizada por Offenbacher em 1996, a resposta inicial, a cargo dos neutrófilos, estimula paralelamente outros tipos celulares, enquanto o sistema de complemento prevê um aumento rápido na resposta anti-inflamatória e de anticorpos produzidos por células plasmáticas; se esta resposta anti-inflamatória for suficiente para controlar o processo de doença, a gengivite é limitada, uma vez que a resposta de defesa do organismo se revelou adequada evitando a progressão da infeção. Em determinadas circunstâncias, porém, os microrganismos podem superar os mecanismos de proteção, com conseqüente invasão tecidual, e uma segunda linha de defesa composta por macrófagos, linfócitos e citocinas atua de forma complementar e mais específica ^{586 cit in 76}.

Outros fatores podem influir na progressão multifacetada destes processos na cavidade oral, incluindo determinadas patologias sistémicas, de entre as quais se destaca a DM (particularmente a tipo 2), que potencia a resposta do hospedeiro aos estímulos microbianos com o conseqüente comprometimento da integridade dos tecidos periodontais ^{577, 587, 588}.

Repetidamente o curso da DM tem sido associado a um aumento da incidência e prevalência de patologia periodontal, apesar de persistirem ainda algumas controvérsias ⁵⁸⁹⁻⁶⁰¹. A susceptibilidade à DP é reconhecida como a “6ª complicação da DM”, integrando a (uma das) ocorrência(s) mais frequente(s) ^{150, 594}. Glickman, autor de uma das teorias mais referenciadas, considera que a DM não constitui, por si, uma causa direta, mas antes uma condição predisponente ^{63, 602}.

Para o reconhecimento da DM enquanto fator de risco para DP é importante que sejam satisfeitos, basicamente, dois dos critérios de análise de risco, de acordo com o referido por Pihlstrom em 2001: plausibilidade biológica de que o fator pode provocar uma determinada doença através de um mecanismo de ação reconhecido, por um lado e, por outro, demonstração, em estudos prospectivos, que o fator de risco precede cronologicamente a doença ⁶⁰³. É esta associação de causalidade DM/patologias periodontais que, em termos de fundamentação, poderá apresentar ainda algumas limitações ⁷⁶.

A DP pode influenciar o aumento dos já elevados níveis de citocinas verificados na DM, contribuindo para um estado inflamatório generalizado. A formação e acumulação excessivas de AGEs nos tecidos, e particularmente a ligação destas moléculas aos neutrófilos, conduz a um estado “hiperinflamatório”, amplificando a resposta às citocinas; estes neutrófilos, já ativados, revelam também uma resposta aumentada em contato com alguns componentes bacterianos, particularmente no biofilme

subgengival, desencadeando de forma acentuada toda a cascata inflamatória, com reflexo na destruição dos componentes periodontais e na própria DM^{76, 600}.

Atualmente uma das questões em aberto relaciona-se com eventuais alterações da própria microflora oral dos diabéticos, as quais poderão contribuir para um aumento da incidência e gravidade da DP em termos de manifestações clínicas^{588, 604, 605}. Nas avaliações desta microflora e de algumas das suas possíveis particularidades os resultados obtidos não têm sido muito consistentes uma vez que, se alguns autores referem uma predominância de espécies de *Capnocytophaga* e vibrios (Gram -) anaeróbios (o que explicaria, de certa forma, o risco aumentado para as DP), outros refutam-na^{155, 577, 606-609}. Alguns autores referem ainda que poderão não existir índices de placa significativamente mais elevados nos diabéticos, apesar do nível de inflamação associado à acumulação de placa bacteriana merecer especial atenção, sobretudo perante situações de deficiente controlo glicémico^{571, 605, 610}. Kadher *et al.*, numa metanálise publicada em 2006, puderam concluir que os diabéticos apresentam, de forma significativa, uma maior gravidade da patologia periodontal do que os não diabéticos, apesar da prevalência não ser muito diferente entre os referidos grupos⁵⁹¹.

Pode afirmar-se que a relevância da resposta do hospedeiro na patogénese da DP constitui a base de muitas das questões colocadas. A influência da microflora subgengival pode convergir numa resposta imunoinflamatória crónica nos tecidos periodontais, com produção local de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, prostanóides e enzimas com potencial destrutivo. Uma referência particular para as MMPs, localmente aumentadas e reconhecidamente envolvidas nos estádios de destruição periodontal mais agressivos (em relação direta com determinados agentes patogénicos periodontais) encontrando-se elevadas concentrações salivares e mesmo serológicas destas enzimas^{76, 611-613}. Por conseguinte, a excessiva e/ou desregulada produção de todos estes mediadores pode conduzir a manifestações de maior ou menor acentuação clínica.

Outra das explicações que visa a interação entre a DM e a DP tem por base a ligação dos AGEs aos seus receptores celulares, mais especificamente nas células endoteliais ou fagocíticas^{13, 154, 582, 614}. Desta forma, os AGEs podem depositar-se nas células mono ou polimorfonucleares com comprometimento das suas capacidades quimiotáticas e fagocíticas, possibilitando a invasão de Gram -, o que poderia explicar o aumento da prevalência, e até da gravidade, da DP nos pacientes diabéticos^{154, 582, 615}. A ligação entre os AGEs e os respetivos receptores foi identicamente observada nos fibroblastos, com repercussões ao nível do colagénio, principal componente do ligamento periodontal; esta interferência com o colagénio parece ser uma das causas de comprometimento dos processos de cicatrização na DM, conforme será oportunamente descrito, bem como de uma eventual diminuição da resistência dos tecidos periodontais às agressões bacterianas^{61, 76}. Oxford *et al.* em 2000 fazem ainda menção a uma redução dos níveis salivares de EGF (*Epidermal Growth Factor* ou Fator de Crescimento Epidérmico) na DM, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de complicações orais e sistémicas⁶¹⁶. Todos estes factos e suposições são convergentes com a definição da DM enquanto condição inflamatória^{61, 617}.

Outro aspeto a ter em conta diz respeito a uma fonte adicional e significativa de citocinas na DM - o tecido adiposo -, o qual segrega ainda adipocinas (importantes estimulantes da resposta inflamatória), destacando-se a leptina, particularmente elevada nos obesos, associada ao risco de desenvolver DM tipo 2 e capaz de promover uma ativação acrescida da resposta proinflamatória no

periodonto, com efeitos ao nível da quimiotaxia nos neutrófilos e da libertação de citocinas pelos monócitos⁶¹⁷⁻⁶¹⁹.

Os mecanismos envolvidos na patogénese, quer da DP, quer da DM, refletem ambos outro tipo de influências, especificamente genéticas e ambientais^{76, 601, 620, 621}. Não sendo, por enquanto, possível associar estas patologias a qualquer tipo de distúrbio ou mutação genética específicos, podem ambas as patologias ser referenciadas como poligénicas, com os fatores genéticos a influírem no grau de suscetibilidade; a associação de ambas as doenças ao genótipo relaciona-se com hipotéticos distúrbios ao nível do cromossoma 6, predispondo à DM e DP, em muito explicados por alterações imunitárias específicas^{622, 623}.

Grande parte das investigações nesta área têm sido realizados numa população de nativos norte-americanos do Arizona (índios Pima), reconhecidos pela inusual elevada prevalência de DM (sobretudo tipo 2), de marcada influência genética ("*thrifty gene hypothesis*")^{617, 624-626}. Dados semelhantes retratando um acréscimo de prevalência da DP e DM (sobretudo tipo 2) são verificados em grupos populacionais europeus e americanos, com menção para a importante influência do controlo metabólico^{361, 627}. Não obstante, também os diabéticos tipo I têm sido apontados como pacientes em risco acrescido de desenvolver patologia periodontal^{598, 599, 620, 628}. Diferentes autores têm centrado as suas investigações, particularmente em grupos de crianças e adolescentes diabéticos tipo I, comparando-os com crianças não diabéticas de grupos etários similares^{63, 541, 542, 571, 590, 591, 620, 629-634}. Num estudo clínico de referência conduzido por Lalla *et al.* em 2006, incluindo num dos grupos 182 crianças diabéticas de idades compreendidas entre os 6 e os 18 anos e, no outro grupo, 160 crianças não diabéticas, pode ser concluído que o compromisso periodontal era superior no grupo de diabéticos⁶²⁹. Já em 2007 Lalla *et al.* efetuaram um outro estudo com o objetivo de determinar quais os parâmetros relacionados com a DM que poderiam, potencialmente, contribuir para uma aceleração no compromisso periodontal em crianças e adolescentes; foram incluídas 350 crianças diabéticas, de idades compreendidas entre os 6 e os 18 anos, concluindo-se que o nível de controlo metabólico poderia ser determinante nesta questão⁶³⁵.

Alguns estudos demonstram que a DM tipo I aumenta o risco de gengivite sendo, no entanto, quase inexistentes os que abordam, concretamente, os tecidos periodontais em fase de dentição primária ou mista^{63, 540, 598, 630, 633, 636-638}. A dentição primária em particular não evidencia com frequência sinais de inflamação gengival, apontando-se várias razões para esta mesma ocorrência: anabolismo aumentado, diminuição da taxa de migração leucocitária, diferenças na composição da placa bacteriana, níveis mais reduzidos de imunoglobulinas especificamente relacionadas com a placa bacteriana e resposta inflamatória vascular retardada^{598, 639}. No entanto, estes efeitos "protetores" parecem não prevalecer nos casos de DM^{598, 638}. De acordo com Lal *et al.*, 2007 (e por outros reafirmado) existe algum valor preditivo da gengivite em dentição temporária em relação à ocorrência da mesma em dentição permanente, particularmente tratando-se de crianças diabéticas; ainda que nem todas as situações de gengivite desenvolvam uma tendência de agravamento, uma propensão acrescida parece verificar-se nestas crianças, acentuando-se a indispensabilidade de cuidados preventivos precocemente instituídos, sobretudo no que respeita aos cuidados de higiene oral^{150, 598, 629}.

Em relação à periodontite, e ao contrário do que se verifica com a frequência de gengivite, é muito invulgar a sua ocorrência em crianças de idade inferior a 12 anos, mesmo quando consideradas as diabéticas. Embora no período da adolescência a mesma possa ser diagnosticada, e salvo raras exceções

de particular agressividade, a gravidade tende a não ser acentuada, com perdas mínimas de suporte periodontal⁵⁷⁶. A prevalência descrita relativamente à DP em crianças e adolescentes diabéticos tipo I tem sido cerca de 10%, em comparação com os 2% nos não diabéticos, mas com resultados discrepantes^{605, 630}. Questões de natureza genética e o grau de controlo metabólico explicarão, pelo menos em parte, estas diferenças⁶⁴⁰.

Se por um lado continuam a ser colocadas questões relacionadas com o efeito do controlo metabólico da DM na DP, por outro questiona-se igualmente o efeito do tratamento periodontal no próprio controlo metabólico^{76, 600}. De acordo com o trabalho de revisão levado a cabo por Taylor *et al.*, 2001, os diabéticos com DP severa têm maior probabilidade de evidenciarem um mau controlo metabólico³⁶. Por outro lado, um controlo inadequado da glicemia pode também exercer influência no curso da DP existindo, portanto, uma reciprocidade nesta influência^{32, 36, 600, 617, 634, 641-651}. Contrariamente outros autores referem que, independentemente de uma significativa melhoria em termos de resolução da infeção periodontal, uma grande parte dos indivíduos visados não manifesta quaisquer melhorias no grau de controlo glicémico^{652, 653}.

Outra das razões aventadas nesta inter-relação DM/DP na dependência do controlo metabólico e conseqüente comprometimento do sistema imunitário diz respeito à particular influência nos fenómenos de quimiotaxia e apoptose: um inadequado controlo metabólico com reflexos na concentração de glicose no fluido crevicular poderá contribuir para a supressão da função dos PMN^{52, 155, 588, 600, 615, 617, 654}. Se em relação aos neutrófilos parece comprovar-se esta hipofunção, já no que respeita à resposta fenotípica monócito/macrófago parece verificar-se uma acentuação da mesma, resultando num aumento significativo da produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios com reflexos na composição do fluido crevicular. É em parte também por esta mesma razão que o nível de citocinas no fluido crevicular tem sido relacionado com o controlo glicémico dos diabéticos^{53, 155, 655}. Em algumas células a hiperglicemia pode ainda conduzir diretamente à ativação de diferentes vias (*Mitogen-Activated Protein Kinase* - *MAP Kinase* - ou *Protein Kinase C* - *PKC*), com estimulação de produção de citocinas e aumento da resposta inflamatória^{52, 656}.

As referenciadas mudanças a nível vascular ao interferirem, quer com o aporte nutricional dos tecidos periodontais, quer na migração dos leucócitos nesses mesmos tecidos, culminam num decréscimo na oxigenação e eliminação de metabolitos, com conseqüências óbvias na gravidade da periodontite e na capacidade de cicatrização; também estas alterações vasculares parecem sofrer influência negativa, quer na relação com a duração da DM, quer com o seu inadequado controlo metabólico^{588, 612, 657, 658}.

Outra das conseqüências da hiperglicemia na DM é uma alteração nos metabolismos proteicos e lipídicos, com rearranjos moleculares complexos associados a um estado de elevado stresse oxidativo e que se repercute também a nível periodontal^{156, 588, 659-663}. Com estes fenómenos de stresse oxidativo parece estar relacionado um decréscimo nos níveis salivares, em diabéticos tipo I, de glutathiona reduzida, um dos principais antioxidantes do meio intracelular⁶⁶⁴.

Especificamente no que concerne às vias metabólicas lipídicas as complicações atribuídas primariamente à hiperglicemia podem ser causadas por um desequilíbrio metabólico a nível lipídico, com aumento dos níveis séricos das LDL (*Low-Density Lipoproteins*), triglicerídeos e ácidos gordos; este desequilíbrio correlaciona-se com perturbações na função dos monócitos e/ou macrófagos e da

hipertrigliceridemia pode resultar ainda uma libertação aumentada de citocinas pró-inflamatórias por parte dos monócitos (TNF α e IL-1 β). Paralelamente, os neutrófilos expostos a elevados níveis de triglicédeos produzem maior quantidade de IL-1 β e evidenciam alterações nas suas propriedades quimiotáticas e fagocíticas^{588, 665-667}.

O TNF α é também algumas vezes referenciado como possível responsável por processos de resistência à insulina⁵⁷⁷. Genericamente, os estados infecciosos/inflamatórios poderão predispor, de forma particular, a alguma resistência no uso de insulina, influenciando o controlo da patologia periodontal e da própria DM^{146, 620}.

Assim, reunindo maior ou menor consenso científico, o grau de controlo metabólico, as alterações no metabolismo do colagénio, o aumento da concentração de glicose e a diminuição do pH salivar, a par de microangiopatias, poderão determinar uma maior agressividade na progressão da DP^{150, 617, 648, 668-670}. A reter será ainda que a concentração mais elevada de glicose no fluido crevicular poderá ser relevante uma vez que, para além de comprometer a atividade fibroblástica, potencia o desenvolvimento, adesão e organização da placa bacteriana, com ação amplamente reconhecida em todo o processo^{533, 620, 641}. Tendo por base os estados de hiperglicemia e a relação com a ação metabólica da placa bacteriana, uma sucessão de reações inflamatórias sinérgicas poderá culminar na destruição, mais ou menos acentuada, dos tecidos periodontais e deficiência nos processos de cicatrização⁶²⁰.

Os níveis séricos de frutamina (reflexo do grau de controlo glicémico nas 2-3 semanas antecedentes) relacionam-se hipoteticamente com o grau de hemorragia e intensidade de inflamação gengival em diabéticos, quer tipo 1, quer tipo 2^{571, 671}. Nas crianças diabéticas tipo 1 a correlação entre os níveis de frutamina e a inflamação gengival parece manter-se, pelo menos, até à adolescência⁶⁷². De forma similar, valores elevados de HbA_{1c} (excedendo os 10%) aparentam exercer marcada influência na predisposição de crianças e adolescentes para a gengivite^{588, 610, 638, 673}. A consistência desta associação levou a que em algumas das classificações das DP seja inclusivamente referenciada uma forma de gengivite designada de "gengivite associada à DM"^{588, 590, 674}.

Mesmo que clinicamente determinados dados apontem para uma melhoria dos sinais e gravidade da gengivite com a normalização do nível glicémico, alguma prudência deverá ser assumida nas generalizações: num estudo longitudinal publicado em 1990 por Sastrowijoto *et al.* abrangendo diabéticos tipo 1 sob terapia insulínica convencional intensiva foi possível verificar uma melhoria significativa de alguns dos sinais da inflamação gengival em concomitância com a melhoria do controlo metabólico; não foi evidente qualquer efeito ao nível da profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem ou índice de placa, facto coincidentemente referenciado por outros autores^{597, 634, 675, 676}.

A duração da DM poderá constituir outro dado relevante na avaliação da susceptibilidade às alterações do periodonto^{571, 677}. Pacientes com duração da DM tipo 1 superior a 10 anos parecem manifestar um comprometimento das estruturas periodontais mais marcado do que outros com diagnóstico mais recente; esta análise confirma-se ser particularmente importante em pacientes com idade igual ou superior a 35 anos, reforçada pelo aspecto que, à medida que avança o curso da doença, hipoteticamente mais graves serão os sinais de patologia periodontal^{571, 577, 630, 677-679}.

O início da destruição dos tecidos periodontais é referenciado em fases muito precoces da DM, tomando-se mais acentuada na passagem à adolescência⁶²⁹. Em 1997 Firatli avaliou uma série de

parâmetros periodontais clinicamente relevantes num grupo de 44 crianças e adolescentes diabéticos tipo 1 por um período de 5 anos, comparando-os com um grupo de controlos saudáveis; pode concluir que relativamente aos índices de placa e gengivais não existiam diferenças significativas entre os grupos em estudo. No entanto, verificou uma maior perda de inserção clínica e uma maior susceptibilidade e gravidade nas manifestações periodontais no grupo dos diabéticos na relação direta da duração da doença ⁵⁷¹. Para além da aparente tendência de agravamento da patologia periodontal com a idade e duração da doença, importa reforçar que, particularmente em relação ao controlo metabólico, os resultados não são, de todo e mais uma vez, consensuais nos diferentes estudos publicados ^{576, 588, 590, 598, 599, 632, 634, 637, 638, 673, 680-682}.

A existência de outras complicações associadas à DM tipo 1 (retinopatia ou nefropatia, por exemplo) é ainda apontada como fator de possível influência no agravamento da condição periodontal, ponderando-se como base comum os transtornos vasculares e resposta imunitária ^{681, 683}. Paralelamente é referido que alguns dos pacientes com DM tipo 1 e periodontite apresentam igualmente maior prevalência de cetoacidose, retinopatia e neuropatia, ponderando-se a potencial conexão das patologias periodontais na exacerbação destas mesmas complicações ^{148, 536, 684, 685}. Ainda neste campo, enquanto a dosagem de insulina não aparenta estar relacionada com os distúrbios periodontais, os pacientes que sofrem especificamente de retinopatia diabética podem evidenciar simultaneamente maior perda inserção periodontal, embora os resultados sejam contraditórios também neste aspecto ^{577, 678, 686}.

Uma outra questão por vezes reportada em pacientes diabéticos relaciona-se com a maior formação de cálculos dentários, eventualmente devida a um aumento dos níveis séricos ou salivares de cálcio na DM tipo 1, com reflexos salivares ao nível da parótida e submandibular ^{63, 427, 547, 636, 687-689}. Da mesma forma, quer os níveis de ureia, quer os de glicose no fluido crevicular estão, por norma, aumentados o que, conjuntamente com alterações estruturais (a nível da membrana basal, por exemplo), e em relação com a glicosilação da hemoglobina, se refletem nas características da microflora. No entanto, a evidência científica disponível aponta estes dados como secundários na patogénese da DP, sublinhando antes a importância da resposta imunológica do hospedeiro como elemento chave em termos de gravidade ^{588, 690, 691}.

Já em relação ao papel das leveduras, não é totalmente claro se as mesmas contribuem para o desenvolvimento da DP ou se interferem especificamente no grau de manifestação clínica nas suas formas crónicas e/ou mais agressivas ⁶⁹²⁻⁶⁹⁶. Todavia, em condições sistémicas particulares associadas, quer a um aumento da resposta inflamatória, quer a imunodepressão, uma elevada prevalência de *Candida (albicans*, em particular) na cavidade oral em geral e, mais especificamente, no biofilme subgengival das bolsas periodontais, pode contribuir na progressão da DP ^{205, 697, 698}.

Uma das limitações significativas na análise das publicações visando a relação DM/DP prende-se com a inexistência, em muitas destas, de uma distinção clara entre diabéticos tipo 1 e tipo 2 ou disponibilização de dados relativos ao controlo metabólico, condicionando a interpretação dos resultados apresentados ^{540, 591, 633, 699-707}.

4.3 Diabetes mellitus e risco de infeções

Ainda que muitas vezes haja tendência para, de forma simplista, em termos clínicos, considerar que os pacientes diabéticos apresentam um risco acrescido para o desenvolvimento de infeções quando em comparação com os não diabéticos nem sempre este paralelismo se verifica^{681, 708}. Algumas referências apontam para que determinados processos infecciosos, e não apenas exclusivamente na cavidade oral, possam ser mais incidentes na DM: assim, reativação de focos de tuberculose, pneumonias, sinusites, otites externas malignas, cistites bacterianas agudas e fúngicas, vulvovaginites por *Candida spp.*, pielonefrites enfizematosas, bacteriúrias, fasciítes necrosantes, infeções das extremidades (pé em particular, e membros inferiores no geral), bacteremias, mucormicoses, infeções de feridas operatórias e infeções por *Streptococcus* do grupo β constituem alguns dos exemplos referidos^{62, 205, 642, 708-711}.

Não obstante um rigoroso controlo da glicemia poder contribuir para uma redução significativa da ocorrência de alterações vasculares, a relação com a suscetibilidade acrescida a infeções não está totalmente esclarecida; a duração da doença e episódios de cetoacidose constituem fatores a valorizar^{642, 681, 708, 712}. Pensa-se no entanto que o facto da microcirculação estar afetada e, conseqüentemente perturbado, em maior ou menor grau, o suprimento sanguíneo, possa exercer algum grau de influência^{62, 681}.

A associação frequente entre a ocorrência de infeções e DM tem merecido, por todas estas questões, diversas reflexões. Na verdade, a principal questão prende-se com a tentativa de perceber qual a influência efetiva de alguns dos mecanismos intervenientes na ocorrência destas infeções; prováveis causas desde logo apontadas como “defeitos” ou perturbações na resposta imunitária, aumento da capacidade de colonização por parte de diferentes microrganismos, presença de micro/macroangiopatias ou neuropatias e um constante e acrescido número de intervenções médicas a que os pacientes com DM são submetidos, muitas vezes em ambiente hospitalar, devem ser devidamente ponderadas^{330, 708}. Alterações específicas nas respostas imunitárias inata e adaptativa foram identificadas em alguns estudos *in vitro*, mantendo-se algumas reticências no que diz respeito à relevância das mesmas nas respostas a infeção *in vivo*, sobretudo em pacientes com adequado controlo metabólico da doença^{642, 713-715}. Em causa está, uma vez mais, a questão da ocorrência de episódios de hiperglicemia poder acarretar um comprometimento funcional dos neutrófilos, monócitos e macrófagos (capacidade de adesão, quimiotaxia e fagocitose, com morte intracelular dos microrganismos e resposta dos LT), acrescida do potencial agravante do compromisso vascular local^{62, 329, 330, 582, 642, 716}. Em simultaneidade, um acréscimo dos valores da glicemia (>12 mmol/L) traduz-se num decréscimo na produção de superóxido, com implicações óbvias na resposta imunoinflamatória^{642, 717, 718}.

Tendo em conta o tipo de resposta imunitária adaptativa humoral nos pacientes com DM, a concentração serológica de anticorpos aparenta não sofrer variação relativamente aos parâmetros considerados normais (em indivíduos saudáveis), conforme comprovado, por exemplo, na reação à vacina pneumocócica ou da hepatite B (administração intramuscular)^{719, 720}. Já no que diz respeito à imunidade adaptativa celular foi possível verificar um certo grau de inibição da resposta proliferativa linfocitária a diferentes estímulos por parte de diabéticos com inadequado controlo metabólico, bem como reações de hipersensibilidade anormalmente retardadas (DM tipos 1 e 2)^{330, 721, 722}. Num estudo realizado por Vergani *et al.* em 1983 envolvendo diabéticos tipo 1 foi constatada uma menor

concentração serológica de fator de complemento C4 (a,b) achado que, *per se*, não constituirá risco acrescido para o desenvolvimento de infeções nesses mesmos pacientes^{722, 723}.

O zinco é outro elemento que é referenciado com alguma frequência tendo em conta a sua hipotética influência na patogénese de infeções em pacientes diabéticos, nomeadamente no que diz respeito a uma eventual alteração na resposta linfocitária, quimiotaxia dos PMNs e secreção de citocinas; contudo, os estudos apresentaram resultados contraditórios e a relevância clínica está ainda por clarificar^{687, 722, 724}. Já em relação às proteínas salivares o efeito que um possível aumento da sua concentração em pacientes diabéticos, em particular de alguns peptídeos específicos (dados obtidos através de análises de proteómica salivar em diabéticos tipo I), possa ter na ocorrência dos processos de infeção/inflamação também deve ser considerado⁷²⁵⁻⁷²⁷. Algumas citocinas, tais como IL-1 β , tTNF- α , IL-6 e PGE2, veem a sua produção aumentada em consequência de infeções crónicas por Gram - e endotoxemia crónica, à semelhança do que acontece na DP, podendo dessa forma contribuir para a indução de resistência à insulina e consequente descontrolo metabólico, acentuando-se a necessidade do controlo estrito e estabilização dos níveis de glicemia⁵⁷⁷.

Sammalkorpi e Yki-Jarvinen *et al.* em 1989 tiveram oportunidade de investigar os mecanismos de resistência à insulina e concluíram que as infeções agudas poderão induzir uma maior e mais duradoura influência na relação direta da atividade das vias glicolíticas^{728, 729}. É ainda referenciado que os níveis de oxidação de glicose parecem estar normais durante as infeções, alterando-se as taxas de eliminação não oxidativa e verificando-se um bloqueio no armazenamento de glicose causado por uma menor síntese de glicogénio, glicogénolise acelerada ou ambos⁷²⁹.

4.3.1 Colonização por leveduras e diabetes *mellitus*

Do género *Candida* fazem parte um conjunto de espécies que colonizam, habitualmente de forma “inofensiva”, vários nichos do corpo humano, incluindo a cavidade oral, tratos gastrointestinal, genitourinário e pele de indivíduos saudáveis; no entanto, sob determinadas circunstâncias, podem causar infeção, designada de candidíase, que pode variar de uma infeção mucosa superficial até doença sistémica grave e potencialmente mortal^{730, 731}.

Em termos de manifestação, esta pode ocorrer sob diferentes formas, agudas ou crónicas, incluindo a candidíase eritematosa aguda ou atrófica, pseudomembranosa aguda, atrófica crónica, ulcerativa, glossite romboide mediana, queilite angular e hiperplástica crónica^{331, 336, 337, 430, 641, 732-739}.

As infeções confinadas à cavidade oral e tecidos envolventes são designadas de candidíase oral primária; a designação de candidíase oral secundária é relativa a alterações em que a candidíase oral constitui uma manifestação de infeção sistémica generalizada⁴³⁰. A sintomatologia oral associada pode incluir sensação de ardor, aumento de sensibilidade, alteração de paladar e, caso haja envolvimento esofágico ou faríngeo, disfagia^{336, 740}. As comissuras labiais são zonas frequentemente afetadas - queilite angular -, bem como o dorso da língua, com atrofia das papilas filiformes - glossite rombóide mediana⁷³⁸. Uma resposta aumentada à colonização por parte das células epiteliais traduz-se numa formação proliferativa de tecido queratinizado, o que explica o aspecto em placas esbranquiçadas muitas vezes evidenciado, tomando-se necessário o diagnóstico diferencial com outro tipo de lesões de natureza leucoplásica⁷⁴⁰.

Não pode ser excluída ainda uma possível influência do padrão genético, marcada em alguns casos por um comprometimento da mieloperoxidase; mesmo ocorrendo com menor frequência poderá existir envolvimento de outras zonas do corpo, nomeadamente pele e unhas – candidíase mucocutânea. Por norma não há invasão para além da zona epitelial superficial, sendo mais raras as formas pseudomembranosas, ulcerativas e orofaríngeas. A co-infecção por *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* descrita na literatura pode implicar algumas particularidades na abordagem clínica ^{336, 740, 741}.

Relativamente à prevalência em indivíduos saudáveis, os resultados representam uma amplitude considerável atendendo sobretudo à idade, utilização de dispositivos protéticos, dieta, hábitos higiénicos, tabágicos e particularidades geográficas e socioeconómicas ⁷⁴²⁻⁷⁴⁵. De forma global considera-se que os valores de prevalência (sujeitos a uma amplitude de variação) se situam nos 30-45% para adultos saudáveis, entre 45-65% para crianças saudáveis e nos 45% para recém-nascidos, assistindo-se a um aumento exponencial perante fatores de risco associados ^{336, 742, 746-749}. Num estudo clínico efetuado em crianças portuguesas com idades compreendidas entre os 8 e os 11 anos seguidas durante três anos, a prevalência variou entre 47 e 27% (pré e pós tratamento dentário, respetivamente); estes valores não são, no entanto, totalmente coincidentes com outros referenciados na literatura ^{413, 419, 750, 751}.

A idade do hospedeiro parece constituir uma determinante na colonização ^{409, 412, 413, 745, 752, 753}. Kleinegger *et al.* em 1996 retrataram uma variação na frequência de colonização oral por *Candida* em função da idade: entre 40 e 59% para as faixas etárias compreendidas entre os 0.5-1.5, 15-18, 30-45 e 60 anos, sendo que especificamente aos 7 anos rondava os 24% ⁷⁴⁵. Clayton e Noble em 1966 num estudo de secção cruzada descreveram um incremento, relacionado com a idade, de cerca de 6% numa população cuja faixa etária variou entre os 5 e os 19 anos ⁷⁵⁴. Já Hannula *et al.* em 1999 determinaram a ocorrência e estabilidade desta colonização, durante 22 meses, em crianças saudáveis (2-24 meses) e não encontraram diferenças significativas relacionadas com a idade ⁷⁵⁵. Em 1988, numa revisão da literatura publicada por Odds, foi referenciado um pico de colonização em bebés com idades compreendidas entre os 7 dias e 18 meses de vida ⁴⁰⁹.

Apesar de todas as tentativas de associação, os resultados disponíveis, escassos e díspares, não permitem que esta relação de causalidade (colonização-idade) se faça de forma bem definida. As barreiras naturais existentes no organismo (com particularidades, essas sim variáveis com a idade), a par de outro tipo de fatores fisiológicos ligados ao meio físico e social, características orais (fase da dentição), hábitos higiénicos e dietéticos, por exemplo, poderão representar fatores importantes a considerar ^{742, 745, 753}. Em crianças muito pequenas a colonização oral e estabilidade das populações de leveduras e/ou a existência de manifestações clínicas poderá diferir, por exemplo, com o facto de a criança ter sido/estar a ser amamentada, ou mesmo ter hábito de sucção de biberão ou chupeta ^{742, 750, 755-757}. Algumas das razões apontadas têm por base, entre outras, o leite materno não estar tendencialmente tão contaminado quanto o biberão e de, adicionalmente, ser rico em agentes de ação antifúngica não específica, nomeadamente IgAs, lisozima, leucócitos e lactoferrina ^{750, 758, 759}. As mães poderão, de resto, contribuir para esta colonização em atos quotidianos, quando sopram a comida na tentativa de a arrefecer ou quando “limpam” a chupeta dos bebés nas suas próprias bocas, o que pode explicar o facto de as espécies que colonizam a cavidade oral de ambos (mãe e bebé) serem idênticas ^{755, 760}.

Em crianças é ainda relatado um acréscimo de colonização oral na presença de lesões ativas de cárie dentária, conforme anteriormente mencionado ⁷⁶¹. Este aumento de colonização oral está

correlacionado, muitas das vezes, com uma acentuada colonização fecal, inclusivamente com estirpes coincidentes, indicando um potencial risco acrescido para candidíase oral ou intestinal⁷⁶². A prevenção da colonização e o controlo local da infeção têm sido apontados como fatores fundamentais na prevenção da disseminação da candidíase^{763, 764}.

Os portadores assintomáticos podem passar a apresentar manifestações clínicas especialmente em situações que conduzam a perturbações do sistema imunitário, DM inclusivamente^{336, 432, 737, 765-770}. Outros fatores, tais como o tipo de dieta, disparidades geográficas e/ou socioeconómicas, terapia antibiótica e antineoplásica são igualmente de considerar^{414, 742-745, 771, 772}. Também o género, alterações do ritmo circadiano, hábitos tabágicos e corticoterapia/antibioterapia podem determinar, com maior ou menor significado, a colonização por *Candida spp.*; assim, o sexo feminino aparenta maior predisposição e, em determinados períodos, como durante o sono por exemplo, poderá existir um crescimento acentuado do número de colónias, o qual decresce após ingestão alimentar e/ou escovagem dentária⁴³⁰. Salguarda-se, no entanto, que uma carga fúngica aumentada na saliva não se relaciona, necessariamente, com sinais clínicos de candidíase e que, virtude da influência de parâmetros variados, modificações na capacidade de produção de saliva podem implicar uma desregulação na carga fúngica ou microbiológica em geral^{323, 331, 433, 745}.

Atualmente este tipo de infeção é encarado com grande relevância em ambiente clínico e responsável por grande parte das infeções em meio hospitalar, verificando-se inclusivamente um aumento da taxa de mortalidade em doentes com formas graves e resistentes de contágio^{212, 731}.

Diferentes publicações tentam retratar, de forma específica, a incidência aumentada de infeções fúngicas na cavidade oral de diabéticos tipos 1 e 2, particularmente por espécies de *Candida*, com resultados não consensuais^{331, 340, 432, 695, 735, 736, 768, 773-781}. As divergências encontradas podem ser em parte explicadas por diferentes comportamentos fisiopatológicos inerentes à DM tipo 1, diferentes do tipo 2, bem como ao próprio indivíduo, nomeadamente, idade, raça, tempo decorrido desde diagnóstico e grau de controlo da doença⁴³³.

Numa revisão da literatura visando a colonização por *Candida spp.* da cavidade oral de diabéticos, incluindo estudos a partir de 1958, são descritos valores muito díspares em termos de prevalência (18-80%); contudo, há que ter em conta que foram utilizadas diferentes metodologias em cada um deles, não existindo uniformização nos critérios de seleção e controlo dos pacientes em estudo, técnica de cultura utilizada, avaliação do grau de controlo metabólico ou regimes terapêuticos em curso³³¹.

No que respeita à diversificação de espécies suscetíveis de identificação preferencial na cavidade oral destes doentes, a *C. albicans* é a mais frequentemente isolada^{735, 775, 782}. Outras espécies - *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. parapsilosis*, *C. famata* e *C. kefyr*, apenas a título exemplificativo - podem também ser identificadas, embora com menor incidência^{331, 775, 783, 784}. Acresce o facto destas espécies exibirem diferentes padrões de suscetibilidade aos agentes antifúngicos disponíveis, o que acarreta consequências na atuação clínica⁷⁸⁵⁻⁷⁸⁷.

Especificamente em relação à *C. albicans*, espécie mais prevalente, trata-se de um microrganismo polimórfico com três entidades morfológicas básicas, nomeadamente leveduras, pseudohifas e hifas. Expressa uma série de mecanismos patogénicos através dos quais pode invadir e colonizar a cavidade oral, conferindo-lhe particular carácter infeccioso^{205, 308, 340, 430, 432, 452, 740, 745, 749, 752, 782, 788-}

⁷⁹¹. Um recurso importante na sua patogenicidade é o reconhecido dimorfismo - mudança entre as formas unicelulares (leveduras) e as filamentosas (hifas) -, sendo que as formas não filamentosas parecem exibir menor capacidade de causar infeção e estimulação imunogénica ^{205, 320, 789}.

Conquanto possa ocorrer um eventual acréscimo no desenvolvimento de colónias e na variabilidade de espécies em indivíduos com inadequado controlo metabólico da DM, o mesmo não parece indiciar obrigatoriamente um acréscimo correspondente na ocorrência de infeções (sintomáticas ou assintomáticas) ^{331, 792}. De acordo com Hill *et al.*, 1989, concentrações de hemoglobina glicosilada com valores a rondar os 12% foram associadas a infeções orais por leveduras, tornando-se mais evidente esta correlação em pacientes com episódios mais prolongados de hiperglicemia; no entanto, o mesmo autor corrobora que a DM não constitui, por si, uma condição que obrigatoriamente conduza a um risco acrescido de infeção a menos que o controlo metabólico seja extremamente deficitário ⁷⁹³. Num estudo de Kumar *et al.* em 2005 englobando pacientes diabéticos tipos 1, 2 e não diabéticos concluiu-se que, apesar de verificado um acréscimo na colonização e carga de *Candida spp.* nos diabéticos, não pareceu existir relação com a terapêutica antidiabética ou o controlo glicémico ⁷⁸¹.

A formação e acumulação dos produtos finais de glicosilação (resultantes de episódios de hiperglicemia) nas células epiteliais da cavidade oral podem contribuir para um incremento de recetores de *Candida spp.*, a par de um aumento da atividade proteolítica e da produção de fosfolipases extracelulares; estes elementos, de marcada influência na patogénese, não são verificados em indivíduos saudáveis ^{340, 428, 794}.

Kumar *et al.*, 1980 mencionaram ainda que o desenvolvimento de hifas, condicionando a gravidade da candidíase, poderá estar analogamente relacionado com a DM ⁷⁹⁵. A formação de fímbrias e produção de glicocálice é apontada como relevante na capacidade de adesão, sobretudo em meios ricos em hidratos de carbono, conforme comprovado em alguns estudos *in vitro* ^{344, 796-798}. Neste seguimento, é referido que a presença de *Candida spp.* na cavidade oral possa ser influenciada pela concentração de glicose salivar (maior concentração, maior colonização), potenciando em paralelo a adesão às células epiteliais, incremento na produção ácida, conseqüente descida do pH e ativação enzimática ^{356, 429, 768, 774, 790, 799-801}. De sublinhar igualmente a possível influência negativa deste tipo de infeções no próprio controlo metabólico da DM, com relevo para a ocorrência de complicações associadas ³³⁵.

Outras possíveis relações têm sido citadas, apesar de não comprovadas na sua totalidade, designadamente entre candidíase oral e deficiências iónicas (ferro, particularmente) ou vitamínicas (A, B1 e B12), para além da ingestão de hidratos de carbono (mais extensamente estudada) ^{336, 429, 430, 730, 742, 758, 799, 802, 803}.

A propósito da associação da colonização por *Candida spp.* e o fluxo salivar estimulado/não estimulado, Hibino *et al.*, 2009, em concordância com outros autores, fazem menção a uma diminuição salivar em indivíduos colonizados, em comparação com não colonizados, apontando-se ainda uma "mutualidade" nesta inter-relação, isto é, a colonização pode influenciar as características salivares e estas o padrão de colonização ^{351, 804, 805}.

A referenciada capacidade de adesão a diferentes tipos celulares exibida pelas espécies de *Candida* torna-se fundamental na sua disseminação, capacidade de causar infeção e persistência nos tecidos orais e extraorais ^{205, 806}. Nikawa *et al.* em 2006 puderam avaliar que a maioria destas espécies adere, de forma preferencial, às células do epitélio gengival; no entanto, fatores ambientais como a dieta,

composição dos fluidos orgânicos e ação dos agentes antifúngicos podem imprimir alterações na superfície celular e, conseqüentemente, na sua capacidade de adesão^{205, 807}. Por outro lado, a hidrofobicidade parece aumentar a adesão às células do hospedeiro e substrato influenciando a formação de biofilmes de *Candida spp.*, para a qual contribui ainda a coexistência de outros tipos de microrganismos comensais integrantes das mesmas comunidades polimicrobianas^{205, 789}.

Um dos fatores de resto apontados como determinantes da patogenicidade destas espécies é a versatilidade de adaptação a diferentes *habitats* para crescimento e formação de comunidades microbianas aderidas, habitualmente designadas de biofilmes. São vastas as condicionantes na formação destes biofilmes, designadamente a disponibilidade de nutrientes/substrato e oxigénio, características salivares, substâncias poliméricas extracelulares (EPS - *Extracellular Polymeric Substances*) e tipos de espécies, não obstante os estudos que reportam estes mesmos fatores apresentarem limitações inerentes à marcada diversidade de protocolos utilizados^{731, 789, 808}.

Na essência a capacidade de adaptação em meios muitas vezes adversos tem por base alterações de pH, cujas variações mais extremas poderão implicar modificações na expressão genética com influência, por exemplo, em termos de morfologia^{205, 809}. Diferentes isolados da mesma espécie de *Candida* podem variar em termos morfológicos na composição de substâncias poliméricas extracelulares e resistência aos agentes antifúngicos, para além da capacidade de formação de biofilmes; algumas das estirpes de *Candida* integram, inclusivamente, uma espécie de flora "residente" em vários locais anatómicos da cavidade oral^{323, 731, 810-812}. Por outro lado, as mesmas estirpes podem colonizar meios em condições aeróbicas e anaeróbicas desenvolvendo mecanismos adaptativos específicos^{205, 813, 814}. Modificações nas respostas imunitárias celular e humoral propiciam, inclusivamente, a colonização infragengival, predominantemente em anaerobiose^{692, 811, 815, 816}.

Normas recentes sublinham a importância de uma abordagem terapêutica eficaz baseada num correto diagnóstico do(s) agente(s) envolvido(s)^{787, 817, 818}. Esta etapa diagnóstica está em muito dependente de métodos de identificação rápidos e precisos; os métodos clássicos, envolvendo análises fenotípicas e testes serológicos, são extremamente morosos, reconhecidamente uma clara desvantagem na sua aplicação. As técnicas de biologia molecular revelam-se uma alternativa capaz de contornar estas limitações, apesar dos custos envolvidos e da marcada exigência de meios técnicos e humanos que acarretam^{819, 820}.

A tendência de variação na colonização e patogenicidade fúngica tem vincado a importância das já supracitadas espécies "não *albicans*" (*non-albicans Candida*), com um conseqüente aumento de resistência à terapêutica convencional, tópica ou sistêmica^{740, 784, 821, 822}. De resto, o prognóstico é favorável na grande maioria dos casos alvo de terapêutica efetiva, apesar das reinfeções poderem ocorrer especialmente em situações de incumprimento posológico, comprometimento grave da higiene oral ou manifesta incapacidade de controlo de fatores predisponentes³³⁶.

4.4 Alterações salivares na *diabetes mellitus*

A saliva é uma secreção seromucosa exócrina constituída por uma mistura complexa de fluidos de diferentes origens⁸²³⁻⁸²⁷. As glândulas salivares major, assim designadas atendendo ao seu tamanho e volume salivar produzido, incluem as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais; as glândulas minor, fundamentais pelos componentes protetores, distribuem-se essencialmente pelo lábio inferior, língua, palato, mucosa jugal e região faríngea^{402, 828, 829}. A secreção salivar pode ser classificada como serosa, mucosa ou mista; a componente serosa tem, maioritariamente, origem nas glândulas parótidas, a mucosa nas glândulas minor e a mista (seromucosa) nas submandibulares e sublinguais^{402, 829}.

Resumidamente, da composição da saliva fazem parte diferentes electrólitos, entre os quais o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio, o bicarbonato e fosfato; da mesma constam igualmente imunoglobulinas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados, tais como a ureia e a amónia. Estes componentes assumem um protagonismo funcional específico em diferentes áreas: o bicarbonato, fosfato e ureia desempenham funções na modulação do pH e capacidade tampão da saliva; as proteínas macromoleculares/glicoproteínas participam no controlo dos fenómenos de agregação e adesão, a par dos relacionados com o metabolismo da placa bacteriana e de defesa; o cálcio, o fosfato e as proteínas participam, conjuntamente, nos processos de desmineralização-remineralização e trocas minerais na superfície dentária; as imunoglobulinas e diversas enzimas promovem atividade antibacteriana^{826, 829}. A concentração destes compostos é geralmente baixa, embora variável, mantendo-se no entanto a importância multifuncional que todos assumem neste fluido biológico, sempre perspectivada de uma forma global e não apenas considerada como “uma soma das partes”⁸³⁰. Todas estas especificidades relativas à composição, funções e influência na biopatogenicidade serão descritas mais pomenorizadamente.

A saliva compõe-se de aproximadamente 99% de água, não sendo considerada um mero ultrafiltrado do plasma; inicialmente, aquando da sua formação nos ácinos glandulares, é isotónica, tornando-se hipotónica ao longo da rede ductal glandular^{825, 827, 831}. Os baixos níveis de glicose, bicarbonato e ureia na saliva não estimulada acentuam a hipotonicidade. A composição salivar varia em relação às componentes glandulares serosa e mucosa. As glândulas major contribuem para a maior parte do volume segregado e conteúdo electrolítico, ao passo que as glândulas minor, apesar de não se destacarem em termos de volume, são responsáveis pelos constituintes plasmáticos; o contributo de cada tipo de glândula para o fluxo salivar total não estimulado varia entre 65%, 23%, 8% e 4%, respetivamente para as glândulas submandibulares, parótidas, Von Ebner e sublinguais^{828, 832-834}.

Em relação aos componentes salivares, além dos de origem glandular, há a considerar os fluidos com origem na mucosa orofaríngea (elevado conteúdo de células epiteliais, microrganismos diversos, resíduos alimentares, derivados sanguíneos ativa ou passivamente transferidos, secreções das vias aéreas superiores e refluxo gastroesofágico) e fluido crevicular (considerado um transudato do plasma); dos derivados sanguíneos constam, habitualmente, proteínas plasmáticas, eritrócitos e leucócitos, particularmente perante estados inflamatórios orais e lesões da mucosa^{611, 825, 835, 836}.

Em termos individuais existe uma grande variabilidade na taxa de fluxo salivar, mesmo na ausência de patologia associada, dificultando o rigoroso estabelecimento de valores padrão⁸³⁷⁻⁸⁴⁰. Genericamente assume-se que a taxa de salivacção (fluxo salivar estimulado, 80-90% da produção salivar

média diária) para um adulto, possa variar entre os 0,7 e os 3,0 mL/min, ao passo que numa criança essa variação possa ocorrer entre os 0,1 e os 6,0-7,0 mL/min, com variações inter e intraindividuais^{405, 828, 837, 838, 840-842}. Ainda em relação às crianças parece verificar-se que, à medida que prossegue o seu crescimento, a taxa de secreção salivar aumenta, com os rapazes a apresentarem valores mais elevados quando comparados com as raparigas; o IMC e a dimensão das glândulas salivares poderão explicar estas diferenças^{837, 841-846}. Têm sido apontados outros fatores com potencial influência, designadamente alterações hormonais, estado nutricional, tipo de dentição, variações geográficas e climáticas^{837, 838, 841, 847-853}.

Do processo que envolve a secreção salivar fazem parte basicamente duas fases: secreção inicial, por parte das células acinares, de um fluido aquoso primário semelhante ao plasma, e de uma subsequente modificação deste durante a passagem através do sistema canalar, impermeável à água. Todo o processo de secreção está sob controlo do sistema nervoso autónomo (simpático e parassimpático), via sistemas de transdução de sinal, que limitam os mecanismos de transporte de iões e de secreção proteica. Diferentes estímulos correspondem a diferentes respostas; assim, quando há predomínio do sistema simpático, as secreções são mais ricas em proteínas, ao passo que o predomínio do parassimpático traduzir-se-á por um maior conteúdo aquoso, mesmo existindo uma grande variabilidade individual no que se refere ao estímulo e secreção por parte dos diferentes tipos celulares, afetando a composição salivar, com ocorrência de picos coincidindo com a estimulação colinérgica^{402, 828, 829}.

A concentração iónica salivar é variável, quer se trate do fluxo salivar não estimulado ou estimulado (mais semelhante à composição plasmática)^{402, 833}. Pode ser constatado que, de facto, a estimulação da produção salivar altera a sua composição: de acordo com Dawes e Kubieniec, 2004, um estímulo salivar conduz a um incremento na concentração de proteínas, sódio, cloro e bicarbonato, a par de um decréscimo na concentração de magnésio e fósforo⁸⁵⁴; parece que a alteração mais significativa consiste num acréscimo na concentração de bicarbonato, a qual aumenta progressivamente durante o período de duração do estímulo, favorecendo a sua difusão na placa bacteriana, neutralização de ácidos, aumento de pH (contrariando a descida ao intervalo de valores do pH crítico) e fenómenos de remineralização^{390, 828, 854-856} *cit in* ⁸²⁹.

Estima-se que, diariamente e em média, sejam produzidos entre 500-1500 mL de saliva (aproximadamente 0,5 mL/min), com flutuações pontuais dependentes de condições fisiológicas e patológicas, de que são exemplo as influências hereditárias, hormonais, psicológicas, estímulos diversos (olfativos, paladar, mastigatórios, medicamentosos, exercício físico, higiene oral, entre outros), diárias e anuais. As flutuações diárias estão em relação direta com o ritmo circadiano, verificando-se um decréscimo acentuado de fluxo salivar durante o sono e picos de produção em períodos de estimulação; já as variações anuais prendem-se com a temperatura média ambiental e grau de desidratação, maior no verão^{824, 829, 833, 834, 846}. O ritmo circadiano interfere, não apenas com o volume, mas também com a concentração de determinados componentes, particularmente eletrólitos e proteínas⁸⁵⁷.

Mesmo no ambiente intraoral é possível, em termos anatómicos, perceber algumas diferenças na secreção, na dependência da localização dos canais excretores glandulares, influenciando a capacidade de remoção dos ácidos produzidos pelas bactérias. Desta forma, será fácil perceber que existirão áreas onde a ação dos ácidos bacterianos se fará sentir de forma mais marcada, a não ser que outros tipos de

mecanismos sejam empregues (mecânicos, por exemplo, durante a higiene oral)^{829, 858, 859}. O designado “volume residual” diz respeito a uma pequena quantidade de saliva - cerca de 0,8 mL - que se mantém na boca mesmo após a deglutição; de acordo com um modelo definido por Dawes em 1983, quanto menor for a quantidade de volume residual, maior será a taxa de depuração ou *clearance* oral⁸⁵⁹.

Disfunções salivares, frequentemente designadas por hipofunções, tornam-se muito difíceis de diagnosticar atendendo a todas as variações enquadradas no “espectro” da normalidade; a subjetividade de diagnóstico é, pois, um ponto a ter em conta. São relativamente frequentes os relatos sintomáticos por parte dos pacientes, referindo maior ou menor grau de secura bucal, com múltiplas consequências funcionais^{823, 860, 861}.

Um eventual comprometimento do fluxo salivar estimulado pode não estar obrigatoriamente associado ao aumento da idade e embora seja possível constatar uma diminuição das mucinas salivares, quer no fluxo salivar estimulado, quer no não estimulado, parece não existir diferença no que concerne à resposta secretora por parte das células mucosas salivares⁸⁶²⁻⁸⁶⁴. Muitas das vezes o que se verifica é que a redução do fluxo salivar nos idosos se manifesta enquanto efeito colateral de determinados regimes terapêuticos, a par de défices e alterações nutricionais^{824, 828, 829}. De forma similar são também identificadas variadas condições sistémicas, por vezes igualmente relacionadas com a idade, cujos efeitos na função salivar podem causar sequelas, a curto ou longo prazo, facto que será sublinhado ao longo deste trabalho⁸⁶⁰.

Em termos funcionais distinguem-se na saliva cinco categorias capitais com influência na homeostasia oral e adequado balanço ecológico: a) lubrificação e proteção; b) ação tampão e de eliminação/depurativa; c) manutenção da integridade da superfície dentária (remineralização); d) atividade antibacteriana; e) paladar e digestão^{823, 829, 861, 865-867}. Conforme já referido, cada um dos componentes salivares atua de forma concertada constatando-se, muitas das vezes, uma sobreposição destas “funções”^{208, 402, 824, 829, 833, 861}. As capacidades tampão e depurativa são asseguradas por componentes particulares nomeadamente, bicarbonato, fosfato, ureia e determinadas proteínas/enzimas/iões (sódio, potássio, magnésio, cálcio, cloro)^{846, 861, 866}. A capacidade tampão restante (que não está a cargo do bicarbonato) é atribuída a peptídeos ricos em histidina de baixo peso molecular^{833, 861}. O pH salivar assume, por norma, valores entre 6,0 e 7,0, denotando alguma acidez, podendo porém sofrer oscilações entre 5,3 e 7,8^{829, 846, 868}.

Apesar da espessura da placa e o número de bactérias presentes condicionarem a efetividade dos sistemas tampão salivares, adequadas concentrações de flúor, cálcio e fosfato mantidas em parte pelas proteínas salivares (estaterinas, histatinas, cistatinas e proteínas ricas em prolina - PRPs), são relevantes na maturação e remineralização do esmalte^{233, 235, 402, 828, 869}.

As glândulas salivares enquanto glândulas exócrinas possuem, no seu conjunto de secreções, componentes imunológicos e não imunológicos que asseguram grande parte da proteção da cavidade oral. Assim, conforme já referido, nos componentes imunológicos salivares incluem-se a IgAs (o mais relevante), IgG e IgM, enquanto as restantes imunoglobulinas presentes em quantidades residuais são, eminentemente, provenientes do fluido crevicular^{206, 235, 402, 421, 833}. Os componentes não imunológicos referem-se a determinadas proteínas, mucinas, peptídeos e enzimas (lactoferrina, lisozima e peroxidase)^{206, 404, 829}. A IgAs, por si, não estimula a resposta por parte do sistema de complemento; no entanto, os fluidos orais podem assumir outro tipo de papel em termos de estimulação quando, perante uma

situação de gengivite por exemplo, há uma marcada influência dos constituintes do fluido crevicular ^{404, 823, 824, 828, 829}.

Sabe-se que os componentes salivares antibacterianos imunológicos e não imunológicos são provenientes, basicamente, de duas fontes - plasma e células ductais (acinares) -, igualmente variáveis de acordo com as respostas a diferentes estímulos. Através da análise das proteínas salivares por métodos clássicos é possível reconhecer que a amilase, as PRPs, a IgAs e a anidrase carbónica são produzidas eminentemente nas glândulas salivares, ao passo que a albumina, a transferrina e a IgG podem derivar do plasma ⁸³³. Encarado como um todo, o conteúdo proteico aumenta proporcionalmente com o aumento do fluxo salivar estando, da mesma forma, sujeito a influências do ritmo circadiano, stresse, flutuações hormonais, estados inflamatórios, infecciosos e variações interindividuais relacionadas com polimorfismos fenotípicos. No entanto, não deixa de constituir um paradoxo o facto de, apesar de toda esta reconhecida capacidade antibacteriana da saliva, a mesma suportar o crescimento seletivo de uma vasta comunidade microbiana ^{829, 857}. A presença de alimentos na cavidade oral pode afetar a composição salivar enquanto estímulo para, por exemplo, ocorrer libertação proteica seletiva ^{870, 833}.

Pequenas quantidades de componentes orgânicos não proteicos podem ainda ser identificados; exemplo dos mesmos são a glicose, o ácido úrico (um dos mais significativos antioxidantes), a bilirrubina, creatinina, lípidos (colesterol, mono/diglicerídeos de ácidos gordos), aminas (putrescina, cadaverina e indol), ácidos α -linoleico e araquidónico ^{833, 834, 871}.

Para a análise salivar revelam-se fundamentais todos os procedimentos adoptados no processo de colheita porquanto constituem o ponto de partida para o rigor exigido em termos diagnósticos ou terapêuticos; assim, devem ser seguidos critérios uniformes e mesmo eventuais medidas restritivas, por exemplo, relativamente à higiene oral e ingestão alimentar previamente à colheita ^{833, 872}.

Uma vez que, quer o fluxo salivar, quer a sua composição são sensíveis a flutuações, torna-se necessária uma rigorosa padronização na colheita. Atualmente são múltiplos os dispositivos e técnicas empregues, não apenas no caso da saliva (total ou advinda particularmente de alguma das glândulas), mas também para o fluido crevicular. A colheita de saliva total (ou fluido oral total) constitui o método mais simples, fiável e representativo do ambiente oral, não necessitando de treino ou apetências especiais por parte do operador; pode ser obtida por movimentos mastigatórios ou através de estimulação ácida. No caso da saliva não estimulada poderão ser utilizados dispositivos adaptados à colheita específica de fluidos orais: o ato de salivar passivamente ("babar", sem quaisquer movimentos orais) ou cuspir diretamente através de um colector constituem duas das formas particulares de colheita possível para este tipo de saliva ^{402, 827, 833, 873, 874}. Após a colheita as amostras de saliva devem ser idealmente mantidas a baixa temperatura, quantificadas e congeladas assim que possível, por forma a preservar ao máximo a integridade dos seus elementos; a refrigeração previne a degradação de algumas moléculas, condicionando ainda a atividade bacteriana que interfere, através de mecanismos enzimáticos ao longo do tempo, sobretudo com os componentes salivares proteicos ⁸⁷².

Os diferentes elementos salivares podem ser parametrizados com recurso a variadíssimas técnicas; não obstante, o plasma continua a ser a amostra biológica preferencialmente avaliada, aventando-se para este facto que a contaminação por sangue e as variações fisiológicas das amostras salivares poderão comprometer a sua análise, uniformização e quantificação ^{833, 872}. Em oposição a esta teoria, Sugimoto *et al.*, 2010 referem que a saliva, pelo facto de poder ser considerada um filtrado

sanguíneo (plasmático), refletirá muitas das condições fisiológicas do organismo ⁸⁷⁵. Esta questão é efetivamente geradora de alguma polémica; na perspectiva de que grande parte dos componentes salivares derivam do plasma, quer por transporte ativo, quer por difusão passiva, a análise salivar poderá assumir relevância em termos diagnósticos, ainda que deva existir uma clara e comprovada correlação entre os níveis plasmáticos e salivares ⁸⁷⁶. Na difusão passiva há que ter em conta que a mesma pode ocorrer apenas parcialmente, enquanto que outros mecanismos (transporte ativo, fenómenos de reabsorção) poderão afetar a correlação analítica entre os níveis plasmáticos e salivares ^{687, 835, 865, 833}.

Muitas das linhas de investigação em curso envolvem os numerosos componentes e funções salivares relativamente a aspectos preventivos, de diagnóstico e tratamento de patologias orais e/ou sistémicas ⁸⁷⁷. O interesse que desperta a utilização da saliva remete-se ao facto da sua colheita ser, em termos operatórios, simples de executar, não invasiva e mais segura para o paciente e operador e o seu armazenamento não ser tecnicamente difícil ou dispendioso, o que representa claras vantagens em relação a outros fluidos orgânicos. Adicionalmente através da análise da saliva é possível proceder a monitorização de diversas substâncias ou componentes biologicamente ativos, natural ou terapêuticamente introduzidos no organismo, estados emocionais, perfis hormonais, imunológicos, neurológicos, influências nutricionais e metabólicas ^{30, 402, 823, 826, 827, 829, 833, 835, 878, 879}.

Atualmente a saliva começa a constituir uma alternativa no diagnóstico e avaliação da susceptibilidade a diferentes patologias orais; exemplos incluem a cárie dentária, patologia periodontal, disfunções glandulares e vários tipos de infeções. É igualmente empregue, por exemplo, na monitorização de determinantes ou marcadores de doenças virais, sarcoidose, tuberculose, patologia gástrica, disfunções hepáticas, S. de Sjögren, doença de Beçhet, fibromialgia e DM; áreas mais recentes de investigação abordam o valor da saliva enquanto auxiliar no diagnóstico de patologias oncológicas, HIV, autismo, prematuridade ou mesmo a sua aplicação na área regenerativa associada a fatores de crescimento ^{30, 235, 402, 611, 825, 826, 833, 861, 867, 880-897, 872, 898-901}. A título exemplificativo cita-se o estudo de Tiberti *et al.* de 2009 no qual se conclui, através da deteção de GADA (*Glutamic-Acid Decarboxylase Auto-antibodies*) e IA-2A (*Tyrosine Phosphatase 2*) na saliva humana, que as alterações imunológicas características da DM tipo I podem refletir-se nas secreções orais e, particularmente, na saliva, reforçando o facto desta poder constituir uma ferramenta poderosa e fidedigna nos estudos da autoimunidade da DM tipo I ⁹⁰². Estes resultados já haviam sido, em parte, antecipados por outros autores ^{79, 903}.

Os avanços na análise global dos componentes biológicos têm progredido de forma notável, com destaque para o DNA (genómica), RNA (transcriptómica), proteínas (proteómica) e metabolitos (metabonómica ou metabolómica, esta última de referência particular a biofluidos) ^{904, 905}. Nicholson acentua, em 1999, a designação de metabonómica, sugerindo que este termo será o mais abrangente de todos os mecanismos respeitantes aos metabolitos celulares ⁹⁰⁶. Basicamente é objectivada a medição da totalidade, ou apenas de uma fração, dos metabolitos de determinada amostra biológica e a quantificação dos mesmos de forma padronizada, resultando em diversas representações passíveis de comparação inter-individual ^{110, 907, 908}. Ao permitir uma avaliação global de estados funcionais tendo em conta influências de regulação genética e alterações das funções enzimáticas e metabólicas, esta técnica apresenta com as restantes ciências “ómicas” alguma complementaridade ^{905, 909, 910}.

Nos seres humanos o número total dos diferentes metabolitos é, até agora, desconhecido em pormenor, representando interesse particular para os investigadores os compostos de baixo peso molecular ("small molecules"), que incluem lípidos, açúcares e aminoácidos, os quais podem fornecer informações importantes acerca do estado de saúde do indivíduo. O metaboloma - conjunto de todos os metabolitos na célula em determinado momento - revela muito do seu estado fisiológico no período da colheita da amostra; atendendo à enorme quantidade de células do ser humano e aos seus diferentes tipos, todas apresentam, potencialmente, diferentes metabolomas. Grande parte da atividade celular situa-se ao nível dos metabolitos: mecanismos energéticos, de comunicação e sinalização são regulados por metabolitos; por outro lado, é a caracterização do comportamento dos metabolitos que melhor reflete o ambiente celular dependente, em si mesmo, do aporte nutricional, exposição química e/ou farmacológica, a par de outro tipo de fatores exógenos que poderão influenciar a saúde geral ^{110, 905, 911}.

Algumas das limitações deste tipo de análises prendem-se com o facto das alterações do perfil metabólico poderem sofrer alguma "diluição" por influência da atividade proteica, ambiental ou outro tipo de eventos bioquímicos paralelos ou intermédios; o tipo de dieta, padrão de sono, idade e consumo de tabaco podem igualmente interferir nos resultados ⁹⁰⁵. Desta forma, o maior desafio que implica o estudo do metaboloma relaciona-se com a complexidade e heterogeneidade química e dinâmica dos vários metabolitos ⁹¹⁰.

A abordagem metabonómica evoluiu a partir dos trabalhos pioneiros de Nicholson e colaboradores, tornando-se uma técnica de análise que, de forma rápida, vasta e completa tem permitido uma notável caracterização de disfunções biológicas, com aplicações clínicas e terapêuticas; os seus campos de investigação e de aplicação reportam-se, por exemplo, à toxicologia, diagnóstico global de múltiplas patologias, genómica funcional, farmacologia, nutrição e dietética ^{904, 906, 912-918}.

Esta medição quantitativa da resposta multiparamétrica dos sistemas vivos aos estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas tem por base a análise multivariada dos perfis espectroscópicos obtidos por Ressonância Magnética Nuclear de protão de alta resolução dos fluidos biológicos - Ressonância Magnética Nuclear de protão (¹H-RMN) ^{878, 904, 906, 907, 917, 919-922}. Os conjuntos de dados obtidos são organizados, após análise, em matrizes complexas de acordo com a intensidade, efetuando-se a sua leitura e interpretação através de métodos quimiométricos variados, nomeadamente *Principal Component Analysis (PCA)*, *Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA)*, *Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)* e *Neural networks* ^{875, 912, 921, 923-925} cit in ⁹¹⁰. Numa primeira etapa da análise metabólica torna-se possível reconhecer tendências com base nas diferenças dos padrões espectrais (aplicável, por exemplo, em amostras de indivíduos com determinada patologia vs indivíduos saudáveis), ilustrando tendências, agrupamentos (*clusters*) e *outliers* ⁹¹⁰.

De forma simplificada pode afirmar-se que são duas as técnicas principais empregues neste tipo de análises: a primeira - Espectroscopia RMN -, tem por base a análise de núcleos ditos ativos (com número atómico e/ou número de massa ímpares) de diferentes moléculas, explorando o comportamento dos mesmas quando submetidos a um intenso campo magnético externo, permitindo a identificação de núcleos diferentes com base na sua frequência de ressonância ^{910, 922, 926}; a segunda hipótese é a separação dos metabolitos por classes moleculares, analisadas por metodologias qualitativas adequadas e, posteriormente, reagrupadas utilizando, para este fim, a espectrometria de massa (*Mass Spectrometry – MS*) e técnicas cromatográficas para separar, identificar e quantificar os metabolitos ^{906, 907, 927}. A

Ressonância Magnética Nuclear de protão ($^1\text{H-RMN}$) é uma das técnicas de eleição em estudos de metabonómica e a razão principal que suporta a sua utilização é o elevado número de metabolitos que podem ser detectados numa amostra biológica sem qualquer requisito prévio de processamento de amostra. Com efeito, o núcleo de hidrogénio tem uma distribuição ampla em moléculas biológicas e as suas propriedades químicas e magnéticas possibilitam uma distinção entre metabolitos muito similares mediante a análise espectral em termos dos desvios químicos das suas ressonâncias e multiplicidades resultantes de acoplamentos escalares ($^n\text{J}_{\text{HH}, n=2,3,4}$)^{832, 910, 913, 915, 927, 928}.

Outras técnicas, de que são exemplo a GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) e a LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*), têm vindo também a ser preconizadas⁹²⁷. A $^1\text{H-RMN}$ e a MS constituem, no entanto, e conforme já referido, os principais métodos analíticos aplicados com esta finalidade, estando o sangue e a urina no grupo dos fluidos biológicos mais estudados, ao contrário da saliva, cuja análise metabolómica tem sido raramente referenciada, apesar do motivo de interesse crescentemente demonstrado^{832, 878, 883, 912, 918, 929-932}.

Neste tipo de técnicas pode existir algum grau de “contaminação” das amostras (pelo estroma envolvente ou células epiteliais, por exemplo), com conseqüente interferência nos perfis obtidos⁹¹⁰. Não obstante, as vantagens da análise da saliva em relação a outros fluidos biológicos já foram amplamente mencionadas^{832, 833, 878, 881, 897, 902, 931, 933-936}.

As concentrações salivares de determinados componentes, designadamente metanol, 2-propanol, etanol, cortisol, teofilina e tolueno, por apresentarem valores semelhantes aos do sangue e urina, têm sido consideradas alternativas na mensuração dos níveis de exposição química; contudo, existem algumas reticências quanto às concentrações de metabolitos usadas como biomarcadores, uma vez que deverão ser assumidas e tidas em particular atenção alterações nos mecanismos metabólicos relacionados, por exemplo, com a espécie, idade, género, concentrações hormonais, ritmo circadiano, dieta, entre algumas outras variáveis de possível influência^{912, 935, 937}. Outra tentativa de correlação entre as concentrações salivares e sanguíneas incluiu a cafeína, perspetivando a possibilidade de utilização da saliva na monitorização dos níveis moleculares na corrente sanguínea; foi referenciado, a este propósito, que as concentrações de diferentes tipos moleculares na saliva podem ser de cerca de 1/10 a 1/100 das concentrações sanguíneas, reforçando as ressalvas em relação à extrapolação direta^{937, 938}. Alternativamente, e com aplicação na área da patologia oral, um estudo recente de Takahashi *et al.* de 2010 descreve a análise da placa bacteriana supragengival concluindo que este tipo de técnica poderá contribuir para o esclarecimento de mecanismos particulares do sistema metabólico da flora oral, de reconhecida importância nos sistemas de regulação⁹³⁹.

Apresentadas todas estas questões, fisiológicas e analíticas, pode afirmar-se que a influência da saliva na saúde oral é, pois, incontornável, não apenas no respeitante à sua composição, mas também ao fluxo; esta influência poderá ser, de acordo com alguns autores, acentuadamente observada na cavidade oral de pacientes diabéticos^{620, 774, 940}. Com resultados não unânimes, alguns trabalhos apontam diferenças na secreção e composição da saliva quando se comparam diabéticos e não diabéticos, enquanto que outros não referem quaisquer alterações significativas^{355, 555, 560, 562, 563, 848, 940-947}. Espelhando estas controvérsias, Siudikiene *et al.* em 2006 referem uma diminuição, em diabéticos, dos fluxos salivares estimulado e não estimulado, enquanto Lopez *et al.* em 2003 mencionam uma redução apenas no fluxo

salivar não estimulado^{555, 562, 942}. Já Belazi *et al.* em 1998 e Edblad *et al.* em 2001 não relatam quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre o fluxo salivar de diabéticos e não diabéticos^{553, 563}.

As explicações apontadas para uma eventual redução na produção de saliva em indivíduos diabéticos prendem-se com razões tão diversas quanto o aumento da diurese (mais marcada na DM tipo 2) em relação direta com a hiperglicemia crónica, redução acentuada no fluido extracelular e perda de eletrólitos na urina, disfunção autonómica, alterações parenquimatosas e da microcirculação glandular^{555, 695, 948, 949}. Em adultos diabéticos foi igualmente possível verificar que a desregulação metabólica pode condicionar alterações hormonais, microvasculares e neuronais com reflexos na funcionalidade de diferentes órgãos⁹⁵⁰. As alterações microvasculares e neuropáticas modificam a resposta das glândulas salivares à estimulação neuronal e hormonal, e dado que a secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autónomo, é possível que exista interferência com a capacidade de resposta individual à estimulação glandular, com repercussões no fluxo e composição salivares⁹⁵¹.

Uma das principais queixas reportadas por indivíduos diabéticos, sobretudo em idade adulta, é a xerostomia ou a hipossalialia^{355, 641, 950, 952}. No entanto, e apesar de algumas queixas sintomáticas, grande parte destes doentes não possui, efetiva e comprovadamente, alteração na taxa de salivação, apresentando uma produção salivar perfeitamente normal; esta aparente contradição poderá estar associada a influências psicogénicas afetando a função salivar⁹⁴⁸.

Aren *et al.*, 2003 referem que os diabéticos poderão evidenciar um pH salivar mais baixo e menor capacidade tampão relacionados, entre outros, com o metabolismo bacteriano da glicose na cavidade oral e/ou, de acordo com Lopez *et al.*, 2003, uma eventual diminuição da concentração de bicarbonato^{562, 620}. Edblad *et al.* em 2001 e Reuterving *et al.* em 1987 não corroboram, contudo, estes achados^{553, 953}. Importante será certamente perceber quão relevantes se poderão tornar, de forma particular, estas eventuais alterações de pH salivar na incidência de patologia oral nos pacientes diabéticos, tendo porém em conta que, para o caso particular da cárie dentária, há que atender a uma multiplicidade de outros fatores etiológicos envolvidos^{562, 942}. É de salientar que a grande maioria das publicações retrata estudos efetuados em adultos diabéticos, não sendo extenso o número que engloba populações de crianças e adolescentes especificamente⁹⁴².

Relativamente à composição salivar Mata *et al.* em 2004 puderam demonstrar concentrações mais elevadas de cálcio na saliva estimulada de diabéticos tipos 1 e 2 (acréscimo na capacidade de secreção glandular de cálcio mais significativa no tipo 1), quando em comparação com indivíduos saudáveis, achado não corroborado, no entanto, por Lopez *et al.*, 2003 e Reuterving *et al.*, 1987^{562, 687, 953}.

A concentração salivar proteica e de diferentes substâncias antibacterianas em pacientes com DM tem sido também descrita, *in vivo* e *in vitro*, ora alterada, ora não sofrendo qualquer variação^{401, 533, 558, 687, 940, 946, 947, 953-955}. A título exemplificativo, Ivanovski *et al.*, 2012 referiram um aumento dos níveis de ureia e glicose e Lopez *et al.* em 2003 reportaram um acréscimo da concentração proteica e de ureia na saliva de crianças diabéticas, quando em comparação com controlos saudáveis^{562, 956}; contrariamente, Tenovuo *et al.*, numa publicação de 1986, não detetaram alterações na concentração salivar de fatores antimicrobianos (lisozima, lactoferrina, peroxidase salivar, mieloperoxidase e hipotiocianato), sendo apenas relevante, no grupo de diabéticos tipo 1 estudados, as diferenças no ratio IgA/IgG⁹⁵⁴. Resultados semelhantes foram obtidos por Belazi *et al.* em 1998, embora neste caso se tenham

detetado algumas diferenças relativamente à concentração de IgA salivar e IgG serológica⁵⁶³. Hagewald *et al.*, 2003 deram conta, por sua vez, da existência de uma maior expressão nos níveis salivares de amilase e IgAs⁹⁵⁷. É paralelamente mencionado que a insulina poderá exercer alguma influência no metabolismo proteico^{958,959}.

Na saliva das crianças diabéticas tipo I os níveis de peroxidase e magnésio têm sido também avaliados⁶²⁰. A este propósito, Mata *et al.*, 2004 e Jin e Yip, 2002 fazem menção a um decréscimo na capacidade secretória glandular de magnésio predispondo, por exemplo, a complicações infecciosas; alterações na concentração e secreção salivar de zinco (com repercussões na formação de cálculos dentários) e potássio foram ainda descritas^{687,960}.

Sublinhando o papel da glicose salivar vários autores apontam para diferenças (tendencialmente no sentido de um acréscimo) de concentração em diabéticos, em comparação com os não diabéticos^{533, 562, 563, 774, 940, 945, 955, 956, 961-963}. Particularmente em relação à molécula de glicose, esta difunde-se com relativa facilidade do soro para o fluído crevicular através da membrana capilar, atingindo a saliva por intermédio do sulco gengival⁹⁴⁶. Desta forma, elevados níveis de glicose sanguínea poderiam hipoteticamente contribuir para alterações patológicas orais diversas tendo por base a ação do metabolismo bacteriano^{552,955,959}. Os níveis normais de glicose salivar rondam os 0,5-1,0 mg/100 mL; de entre as doenças orais potencialmente associadas a concentrações elevadas de glicose salivar sublinham-se a candidíase e a cárie dentária, muito embora outras, desenvolvidas em subcapítulo próprio (ver 1,4,5), possam ser referenciadas^{641,964}.

Algumas hipóteses levantadas relacionam-se com a verificação, na DM, de um aumento da permeabilidade membranal basal da glândula parótida, culminando num aumento dos níveis de glicose salivar, particularmente existindo níveis elevados de glicose sanguínea (fases de descontrolo metabólico); no entanto, mantém-se por esclarecer a linearidade da relação tendo em conta os resultados contraditórios da literatura^{162, 541, 562, 563, 572, 688, 774-776, 824, 940, 941, 943-946, 953-955, 959, 961, 963, 965}.

Interrogada é igualmente a relação entre os níveis de glicose salivar, o fluxo salivar e a duração da DM^{774,944,966}. Uma das possibilidades aponta para uma diminuição dos níveis de glicose salivar com o aumento da duração doença em resultado da infiltração acinar por tecido adiposo e microangiopatia das glândulas salivares^{355,959}.

A tentativa de, através de um método não invasivo de análise salivar, tornar possível a monitorização do controlo metabólico da DM não parece constituir, para já, uma alternativa à técnica convencional de análise sanguínea⁷⁷⁴. No entanto, a retenção oral de hidratos de carbono provenientes da dieta, o metabolismo glicolítico de grande parte da flora oral, a libertação de hidratos de carbono por parte das glicoproteínas e a influência da composição do fluído crevicular e da eventual diminuição do fluxo salivar constituem pontos a atender nestes doentes^{961,967}. Um adequado controlo da glicemia poderá refletir-se positivamente na diminuição da ocorrência e/ou severidade da maior parte das manifestações patológicas orais descritas, particularmente hipossaliva e candidíase, contribuindo para a sua resolução (na dependência do restabelecimento da função salivar)⁶⁴¹. Não obstante, e mesmo em situações de adequado controlo metabólico, a DM pode culminar em alterações marcadas na secreção e composição salivares, com diferenças em termos de gravidade tratando-se do tipo I ou do tipo 2⁶⁸⁷.

4.5 Outras alterações orais na diabetes *mellitus*

4.5.1 Alteração dos padrões de erupção dentária

Os dados disponíveis acerca dos efeitos da DM na erupção dentária são escassos. Em 1944, Ziskin *et al.* referem alguma influência da DM no desenvolvimento dentário, ainda que não muito significativa ⁹⁶⁸ *cit in* ^{63, 969}. Contudo, mais tarde outros autores fazem menção a uma aceleração no desenvolvimento dentário de crianças diabéticas com idade inferior a 11,5 anos, enquanto as mais velhas, pelo contrário, parecem evidenciar algum atraso tendo por base os padrões de referência ^{63, 969-971}. Estes achados estarão relacionados com os efeitos locais e sistémicos da DM, particularmente com o grau controlo metabólico e, eventualmente, com alterações durante o estado de pré-diabetes ^{63, 969}.

Alguns destes resultados contraditórios levaram a ponderar a hipótese de existir uma dualidade, complementar, nos mecanismos que influenciam as fases intra e extra-alveolar da erupção dentária, exercendo a DM efeitos na fase extra-alveolar; enquanto a fase intra-alveolar estará dependente, em primeira instância, de sinais moleculares gerados pelo próprio folículo dentário, a fase extra-alveolar aparenta condicionar mais significativamente a formação radicular e a aposição óssea na região apical ^{13, 969, 972, 973}. Uma possível interferência da função hipofisária foi igualmente apresentada ⁶⁸⁸. Embora os mecanismos precisos envolvidos nos padrões de erupção dentária não estejam perfeitamente esclarecidos, estudos em modelos animais demonstraram a importância de determinados fatores de crescimento (relacionados, inclusivamente, com os receptores de insulina), igualmente preponderantes no estabelecimento da oclusão ^{969, 974}.

Paralelamente, a inflamação gengival mais persistente nas crianças diabéticas relacionada com estados de hiperglicemia poderá contribuir para alterações ósseas locais influentes na erupção dentária, acelerando-a, podendo ainda culminar em perda dentária prematura ^{975, 976}. De acordo com Lal *et al.*, 2008 as crianças com DM em fase de dentição mista tardia (10-14 anos) manifestam uma propensão acrescida para erupção dentária precoce, quando comparadas com crianças não diabéticas; segundo os mesmos autores, este período dinâmico marcado pela puberdade e crescimento acentuado, poderá potenciar os efeitos sistémicos da DM na aceleração da erupção dentária ⁹⁶⁹. É apontada uma possível associação entre erupção dentária precoce, IMC e DM, com alusão à influência de um estado pré-diabético e proinflamatório que frequentemente antecede as manifestações clínicas mais marcadas ^{969, 977}.

É necessário referir que a avaliação da cronologia da erupção dentária tendo por base comparativa as tabelas padronizadas (nas quais se disponibilizam intervalos de referência de suposta "normalidade") apresenta algumas limitações uma vez que a multiétnicidade populacional não está devidamente refletida nas mesmas ⁹⁶⁹.

4.5.2 Alterações nas glândulas salivares

A sialose consiste num aumento, geralmente assintomático, do volume das glândulas parótidas podendo atingir, embora com menor frequência, outras glândulas. É um achado relativamente frequente na DM e culmina num comprometimento da produção saliva; não se trata de uma patologia inflamatória ou oncológica, mas de carácter degenerativo sendo, por esta mesma razão, menos frequente em crianças ^{356, 978, 979}. Desconhece-se o mecanismo exato que explica a sua ocorrência apontando-se, no

entanto, uma eventual alteração na regulação neuro-anatómica glandular causada por uma perda de mielinização e conseqüente atrofia das células mioepiteliais como uma causa possível. Na sialose característica da DM o aumento glandular deve-se essencialmente a infiltração adiposa do parênquima, afetando células acinares e ductais ^{62, 980-982}. São igualmente apontadas outras possíveis causas de hiperplasia glandular “compensatória” em relação direta com níveis reduzidos de insulina e xerostomia, nomeadamente, alterações/inibições enzimáticas ⁶⁸⁸. Também nesta situação, uma vez mais, parece existir uma influência negativa do inadequado controlo metabólico da DM ^{792, 980, 983}. Segundo Musumeci *et al.*, 1993 poderá ocorrer um aumento da atividade enzimática salivar (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase), habitualmente indicativa de dano celular, quer na DM tipo I, quer na tipo 2 ⁹⁸⁴. Não obstante, este facto não foi confirmado por Cinquini *et al.*, 2002 que, constatando não existirem diferenças na atividade enzimática entre diabéticos tipo I e controlos, conjecturaram que essas diferenças poderiam fazer-se sentir devido à duração da doença, correlacionando-se negativamente ⁹⁸⁵.

A DM tipo I parece poder ainda, no entanto, causar danos nas glândulas salivares na dependência direta dos tipos de resposta imunitária, sobretudo tratando-se de pacientes mais jovens ⁹⁸⁶.

4.5.3 Halitose

A halitose, com odor tipicamente cetónico, é um dos primeiros sinais no diagnóstico da DM. O odor provocado pelos compostos sulfurados voláteis (CSV) pode, de forma semelhante, estar relacionado com a saburra lingual ou a doença periodontal, razões pelas quais os odores orais têm sido extensamente estudados com fins diagnósticos ^{62, 987-989}.

É referida ainda a possibilidade de avaliar indiretamente os níveis de glicose circulante nos diabéticos tipo I através da monitorização do ar expirado. Durante estados de hiperglicemia estes pacientes possuem níveis elevados de ácidos gordos e metilnitros na corrente sanguínea os quais, por stress oxidativo, originam um odor característico; de forma similar, o facto dos pacientes diabéticos manifestarem no seu hálito os já referidos níveis consideráveis de acetona (mesmo em estados de normoglicémia), a quantificação destes poderá, eventualmente, ser considerada na avaliação do níveis de glicose sanguínea, constituindo um dos indicadores de diagnóstico ^{62, 990, 991}. Apesar de bastante promissoras, basicamente por envolverem procedimentos não invasivos, são necessários ainda muitos estudos para fundamentação científica do potencial valor destas técnicas de diagnóstico face às convencionais ⁶².

4.5.4 Saburra e outras manifestações linguais

Basicamente, devido às alterações salivares verificadas (fluxo e viscosidade), condicionantes das ações antimicrobiana e depurativa, verifica-se uma retenção acrescida de células epiteliais descamativas, restos alimentares e microrganismos em particular na superfície lingual; o crescimento e deposição, nesta superfície, de aglomerados bacterianos designa-se de saburra lingual (*tongue's coat*) ^{62, 988}. Os microrganismos envolvidos na língua saburrosa são frequentemente anaeróbios Gram -; quando existe

invasão ou contaminação por microrganismos proteolíticos anaeróbios produtores de substâncias odoríferas (CSV, por exemplo) surge halitose, com maior ou menor preponderância do metilmercaptano, dimetilsulfeto ou sulfeto de hidrogénio ^{62, 987, 992-994}.

Alguns estudos referem-se à saburra lingual como nicho ecológico de diferentes microrganismos corresponsáveis, não apenas pela formação da placa dentária, mas por patologias tão diversas quanto cárie, doença periodontal, a já referida halitose, patologia pulmonar, gastrite por *H. pylori*, entre outras ^{62, 987, 989, 993-999}.

A ocorrência de língua fissurada é descrita como mais frequente nos diabéticos tipo I, particularmente associada a perturbações do fluxo salivar, mas igualmente a alterações do meio oral determinadas geneticamente ou em consequência da idade ³⁵⁷. Macroglossia, alterações anatómicas dos bordos linguais, glossite migratória benigna (língua geográfica), nódulos xantomatosos e hiperemia das papilas fungiformes têm sido igualmente descritos ^{540, 1000}.

4.5.5 Disgeusia

Uma das causas mais frequentemente identificadas em associação com alterações de paladar é o comprometimento do fluxo salivar por influência das, já repetidamente mencionadas, complicações neurológicas da DM e respetivo grau de controlo metabólico; no entanto, o tipo de padrão respiratório (respiração bucal, com secura acrescida das mucosas), deficiências de gustina e zinco, a já referida saburra lingual e a ação de CSV podem analogamente constituir fatores importantes na sua ocorrência, a par de intoxicação por metais pesados e determinados elementos terapêuticos administrados cronicamente ^{62, 153, 360, 792, 952, 964, 983, 1001-1003}.

Muitas das vezes as consequências destas perturbações de paladar refletem-se na escolha de nutrientes, tomando-se a dieta tendencialmente mais rica em produtos açucarados, com provável influência no controlo glicémico; por outro lado, tende ainda a verificar-se um aumento do consumo de sal, desfavorável ao já pré-tendencial estado hipertensivo destes pacientes diabéticos ^{62, 964, 1004-1007}.

4.5.6 Síndrome de ardor bucal

A etiologia do síndrome de ardor bucal ("*burning mouth syndrome*") é multifatorial mas, por motivos de sistematização, a divisão dos fatores etiológicos faz-se de acordo com três grandes grupos: fatores locais (ex. alergias, irritações mecânicas, infeções, hábitos parafuncionais), sistémicos (ex. doenças hematológicas, défices nutricionais, menopausa, medicações) e psicogénicos (ex. ansiedade, depressão). Alguns autores sugerem poder tratar-se de uma variante da dor facial atípica, com causas orgânicas na sua gênese, em oposição aos fatores psico-neurológicos habitualmente apontados como principal razão ¹⁰⁰⁸⁻¹⁰¹⁵. Caso não possa ser claramente identificada qualquer patologia associada aos sinais/sintomas, a entidade passa a ser definida como BMS primário ou idiopático (o mais prevalente), enquanto a definição de BMS secundário se aplica no caso de existir, concomitantemente, algum distúrbio oral ou sistémico associado ¹⁰¹⁴.

Muitas vezes esta condição aparece referenciada na literatura com outro tipo de designações, nomeadamente glossodínia, glossopirose, estomatodínia, glossalgia, síndrome dos lábios ardentes, disestesia oral, “*hot tongue syndrome*”, estomatopirose, disestesia bucofaríngea psicogénica, parestesia oral psicogénica e estomatite protética dolorosa^{363, 1013, 1014, 1016}. Esta multiplicidade terminológica reflete a diversificação de sintomatologia e a ausência de critérios de diagnóstico que, com precisão, identifiquem a entidade patológica em causa³⁶³.

Os sintomas, em muitos casos de avaliação subjetiva, consistem num conjunto de sensações crónicas, desagradáveis, muitas vezes dolorosas, tais como queimadura, disgeusia, dormência, disestesia e dor inespecífica, acometendo estruturas intra e/ou periorais^{363, 1013, 1014, 1017-1019}. Estas manifestações são consideradas, isolada ou globalmente, patognomónicas do BMS. Grande parte dos casos não apresenta geralmente, de forma manifesta, qualquer deficiência oral ou doença sistémica subjacente; não obstante, diferentes estudos realizados nas últimas décadas têm associado este síndrome à DM tipos 1 e 2, ou às suas complicações^{363, 1017, 1020-1023}. As relações causais propostas entre a DM e o BMS incluem o grau de controlo metabólico e a neuropatia diabética^{979, 1021, 1022}. Foi demonstrado que, em alguns casos, da melhoria do controlo metabólico resultou, igualmente, uma melhoria sintomática^{979, 1024, 1025} *cit in*³⁶³. Apesar da semelhança dos processos patogénicos envolvidos, tanto na neuropatia diabética quanto no BMS, os diabéticos tipo I são mais susceptíveis a um conjunto de distúrbios que podem igualmente evocar as manifestações clínicas do BMS, nomeadamente candidíase, alterações no fluxo salivar e xerostomia, atrofia das papilas linguais e ulcerações mucosas traumáticas^{363, 738, 1008, 1014, 1017}.

No que diz respeito à frequência de ocorrência, os dados apontam para uma ocorrência superior em mulheres, muitas vezes associada à menopausa (embora carecendo de evidência científica)^{363, 1020, 1021, 1026-1028}. Em crianças diabéticas tipo I os dados são escassos, com destaque para a referência de Costa *et al.*, 2004 apontando uma prevalência de 11,5%¹⁰²⁹.

4.5.7 Líquen plano e reações liquenóides

Existem referências na literatura acerca de uma ocorrência mais acentuada de líquen plano oral em pacientes com DM tipos 1 e 2 do que em controlos saudáveis sem porém ser feita menção específica a crianças e adolescentes. Poderá constituir um efeito secundário (ou paralelo) dos agentes hipoglicemiantes ou de outro tipo de fármacos (anti-hipertensores, por exemplo); no entanto, este possível aumento de prevalência não é unânime^{357, 1030, 1031}.

4.5.8 Ulcerações e fibromas traumáticos

As alterações dos padrões de cicatrização poderão explicar uma eventual ocorrência acrescida de ulcerações e fibromas por trauma nos diabéticos tipo I, de acordo com a referência de Guggenheimer *et al.*, 2000³⁵⁷.

4.5.9 Alterações pulpares

Garber *et al.* em 2009 num estudo laboratorial em ratinhos (grupo diabéticos/controlos) concluíram que a hiperglicemia afeta negativamente os fenómenos envolvidos na regeneração pulpar¹⁰³². Este facto estará em muito relacionado com a inibição das funções dos macrófagos, conforme já descrito anteriormente, resultando num estado inflamatório desfavorável e condicionando os processos de angiogénese, proliferação celular e cicatrização^{329, 330, 1032, 1033}.

É igualmente mencionado que os pacientes diabéticos com indicação para tratamento endodôntico podem ter um incremento de sintomatologia dolorosa, particularmente na presença de patologia perirradicular; resultados preliminares indicam que algumas espécies bacterianas podem ser mais prevalentes na polpa necrótica de diabéticos comparativamente aos não diabéticos¹⁰³⁴.

4.5.10 Outras alterações

É relatada na literatura a possível ocorrência de hipoplasias de esmalte em crianças filhas de mães diabéticas, para além da associação entre neuropatia diabética, perda dentária e disfunção da ATM, sobretudo nos diabéticos de idade mais avançada^{669, 794, 824, 944, 954, 959, 1035, 1036}. Num estudo de 2012, Yeh *et al.* fazem menção à ocorrência de hipomineralização e abrasão do esmalte em ratos diabéticos tipo I na dependência da hiperglicemia e redução do fluxo salivar¹⁰³³.

5. A abordagem da criança diabética na consulta de Medicina Dentária

As crianças e adolescentes com DM enfrentam diariamente desafios significativamente diferentes das crianças e adolescentes saudáveis atendendo ao controlo da doença exigido. A qualidade de vida pode ficar comprometida, de forma mais ou menos acentuada, após o diagnóstico (independentemente do tipo), em particular nas raparigas adolescentes, pela maior deficiência no controlo metabólico e perturbações comportamentais/psicológicas¹⁰³⁷⁻¹⁰⁴⁰. No entanto, deve salientar-se que existe um conjunto de fatores a ter em conta neste tipo de avaliação, nomeadamente a idade, envolvente social e económica, tipo de regime terapêutico e gravidade da patologia^{1038, 1040, 1041}.

Uma questão igualmente importante é a do acesso à consulta de Medicina Dentária. Num estudo recente Tagelsir *et al.* 2011, referem a inexistência de diferenças estatisticamente significativas em relação à experiência de cárie entre crianças e adolescentes diabéticos e saudáveis; no entanto, os autores verificaram a prevalência marcadamente superior de lesões de cárie não tratadas no grupo de diabéticos, assinalando-se um menor acesso aos cuidados médico-dentários⁵³⁵. Moore *et al.*, 2000 fazem referência aos pacientes diabéticos que, no caso específico dos Estados Unidos da América, são submetidos a um maior número de consultas médicas, atendimentos de urgência e cuidados hospitalares, relativamente aos não diabéticos. O reflexo a nível económico é óbvio, calculando-se que as despesas médicas *per capita* (tratando-se de um diabético) sejam acentuadamente superiores (2-10 vezes), para além do absentismo escolar e laboral (direto e/ou indireto) e do tempo investido na monitorização diária da doença; estas questões económicas e de dispêndio de tempo poderão justificar o grau de descuido/despreocupação em relação, especificamente, aos cuidados preventivos orais¹⁰⁴²⁻¹⁰⁴⁴.

Apesar de todas estas condicionantes, e uma vez que a prevalência da DM está a aumentar de forma muito significativa, será fácil constatar que, também na consulta de Medicina Dentária, sejam exigidos cuidados acrescidos na abordagem deste tipo de pacientes^{59, 153, 617, 1045}. No entanto, esta questão relativa à importância da saúde oral como parte integrante do regime de monitorização da DM apenas muito recentemente (2008) foi assumida pela *American Diabetes Association*, fazendo-se referência a um conjunto de medidas preventivas relativas à ocorrência e gravidade das diferentes complicações da DM incluindo, explicitamente, a necessidade de inclusão da monitorização na consulta de Medicina Dentária^{1046, 1047}.

O Médico Dentista deve assumir um papel importante na referência da criança diabética para avaliação cuidada por parte Endocrinologista Pediátrico, sendo que o inverso também deverá verificar-se, constatando-se a existência de um desconhecimento acentuado no que respeita esta premência; qualquer criança com sinais e sintomas de DM não diagnosticada, orais e/ou sistémicos, deve ser imediatamente sinalizada para adequado acompanhamento^{13, 360, 1047-1051}.

A criança diabética deve estar pormenorizadamente caracterizada na sua história clínica, com destaque para o tipo de regime terapêutico em cumprimento, grau de controlo metabólico, frequência de episódios de hipoglicemia, tempo decorrido desde o diagnóstico e complicações associadas^{641, 983, 1042, 1047}. Deve existir, o mais precocemente possível, a preocupação de incluir a cavidade oral da criança no grupo de estruturas anatómicas (tecidos, órgãos e sistemas) a vigiar de forma contínua e rigorosa, imediatamente após o diagnóstico da doença^{13, 1047}. A colaboração mútua e comunicação permanente entre o Médico Dentista e restantes clínicos resultará proveitosa para a criança⁹⁶⁴. A

facilitação atualizada dos dados laboratoriais referentes à doença poderá ser importante na planificação dos tratamentos dentários e na redução de hipotéticas complicações operatórias e pós-operatórias ^{1047, 1052}.

Uma vez que é estimada a existência de um número desconhecido, mas preocupante, de diabéticos não diagnosticados, os sinais orais enquanto possíveis manifestações clínicas constituirão um alerta para o pedido de execução de exames complementares ^{13, 1053, 1054}. As alterações verificadas nos tecidos periodontais dos pacientes diabéticos, e particularmente nas situações em que exista história familiar de DP, devem corresponder a um motivo acrescido de preocupação para o Médico Dentista; este poderá ser um dos sinais coadjuvantes do diagnóstico, ponderando-se a necessidade de referência precoce para a consulta de Periodontologia tendo em mente as complicações inerentes ^{13, 146, 593, 601, 617, 634, 1047, 1052, 1055}.

Adicionalmente, o Médico Dentista tem a oportunidade e responsabilidade de educar e esclarecer os seus pacientes acerca das possíveis consequências da doença na cavidade oral, sublinhando e promovendo os cuidados preventivos indispensáveis à minimização da sua ocorrência; complementarmente deve ser enfatizada a realização de consultas de controlo com maior regularidade, dando particular relevo ao cumprimento de hábitos de higiene oral ^{63, 538, 591, 617, 636, 1056, 1057, 13, 146, 601, 964, 1042, 1058, 1059}.

O Médico Dentista deverá, por outro lado, estar familiarizado com os principais fármacos e regimes terapêuticos utilizados na DM e certificar-se que a criança os cumpre criteriosamente, a par das normas dietéticas e nutricionais simultaneamente influentes no controlo metabólico e na ocorrência de patologia oral ⁹⁶⁴. Uma dieta estrategicamente definida pode elencar um efeito modulador em termos de prevenção, tratamento e monitorização, não apenas de diferentes condições metabólicas/ sistémicas mas também, de forma concreta, de algumas patologias orais ^{1060, 1061}.

Esta associação que engloba comportamentos dietéticos com outros relacionados com estilos de vida, pode (e deve) servir de base a muitas das intervenções educativas na criança diabética ^{135, 1061}. Sabe-se atualmente que o grande aumento da ocorrência de DM nas crianças, sobretudo em determinadas minorias populacionais, poderá estar ligado ao preocupante incremento da obesidade infantil e escassa atividade física ^{1058, 1062, 1063}.

No que respeita à atuação clínica tecem-se algumas considerações; assim, perante a necessidade de submeter a criança a tratamento dentário, e estando em causa uma abordagem cirúrgica, devem ser previamente avaliados (e eventualmente corrigidos) os valores de glicemia por forma a evitar episódios graves de hipo/hiperglicemia antes, durante ou depois da intervenção. Ainda no capítulo dos cuidados antecipatórios o Médico Dentista deve certificar-se que a criança se alimentou devidamente, para além do cumprimento da terapêutica habitual, ponderando a hipótese de ter que ser ajustado o esquema terapêutico, sobretudo se presentes condicionantes dietéticas ^{59, 146, 641, 983, 1052}.

No que concerne aos efeitos da ansiedade e possíveis consequências na regulação da glicemia (dependentes dos níveis endógenos de cortisol), o agendamento das consultas deve ocorrer preferencialmente pela manhã ^{641, 983}. Por outro lado, este mesmo agendamento para diabéticos tipo I deve ter em consideração os picos de atividade insulínica (atendendo ao risco de episódios de hipoglicemia), assim como a necessidade de ajustamento do tempo de duração da consulta ^{13, 983}.

Em caso de necessidade de recurso a técnicas de sedação consciente ou anestesia geral para intervenção oral devem ser obrigatoriamente mensurados os valores de glicemia antes, durante e após os procedimentos, dependendo do tempo exigido para levar a cabo a intervenção ¹⁰.

A complicação mais grave passível de ocorrer durante o tratamento é, efetivamente, um episódio de hipoglicemia, cuja probabilidade é acrescida durante o pico da atividade de insulina. Os sinais e sintomas iniciais aos quais deve ser dada especial ênfase incluem alterações de humor, decréscimo de espontaneidade, irritabilidade e fraqueza, podendo seguir-se de incoerência e taquicardia; caso não sejam adoptadas medidas adequadas as consequências podem ser graves incluindo perda de consciência, hipotensão, hipotermia, estado convulsivo, coma e até morte ^{10, 983}. Perante esta situação qualquer procedimento deve ser imediatamente suspenso e administrados 15 g de hidratos de carbono de ação rápida (fonte direta de glicose); a glicemia deve ser, então, reavaliada e readministrada, se necessário, uma quantidade adicional de hidratos de carbono ^{10, 983}. Em caso de inconsciência e incapacidade na deglutição deve proceder-se a administração (via endovenosa, subcutânea ou intramuscular) e na dosagem adequada, de dextrose ou glucagon, ponderando assistência complementar em meio hospitalar ^{983, 1064}. O Médico Dentista estará apto a utilizar um glucómetro e terá acessível, no consultório dentário, fontes de glicose, para a eventualidade de ocorrência de um episódio deste tipo ^{641, 964}.

Os episódios severos de hiperglicemia associada a cetoacidose são mais raros e de início mais demorado, manifestando-se com náuseas, vômitos, dor abdominal e hálito cetónico, exigindo a administração de insulina; o grande problema prende-se, no entanto, com a dificuldade que muitas vezes representa a distinção entre um episódio de hipo ou hiperglicemia com base, apenas, na avaliação sintomática, sendo preferível, pela gravidade e potenciais sequelas, que se proceda, por defeito, como se de um episódio de hipoglicemia se tratasse, monitorizando a resposta subsequente ⁹⁸³.

Em caso de infeção oral aguda ou num período pós-cirúrgico imediato poderá estar indicada, não apenas antibioterapia, mas também um ajuste posológico da insulina com o objetivo de prevenir a ocorrência de hiperglicemia (muitas vezes influenciada pela dor e o stresse) ou de infeções pós-cirúrgicas e comprometimento do processo de cicatrização ^{641, 964, 1065}. Ainda que sem possibilidade de transposição direta para crianças, um estudo desenvolvido por Golden *et al.* em 1999 define, para adultos diabéticos submetidos a cirurgia cardíaca, o risco de infeções na dependência dos níveis de glicose sanguínea em jejum: acima de 230 mg/dL este risco aumentará cerca de 80% ¹⁰⁶⁶. Não obstante, o recurso a antibioterapia não é obrigatório para todos os pacientes diabéticos submetidos a procedimentos dentários de rotina, devendo a opção relativamente à prescrição ser ponderada com base em critérios individuais assentes na "competência" imunitária ^{146, 1052}. Uma ressalva deve ser feita para alguns pacientes com patologia periodontal mais grave (adultos, maioritariamente), em que a ação de um antibiótico sistémico (tetraciclina ou doxiciclina) poderá coadjuvar o tratamento periodontal e contribuir, inclusivamente, para uma melhoria no controlo glicémico ¹⁴⁶. Nestas situações, as tetraciclinas, de uso condicionado em crianças, parecem constituir nos adultos diabéticos o antibiótico de eleição uma vez que diminuem a produção de MMPs, habitualmente elevadas nestes pacientes ^{600, 1067}.

Outros fármacos usados na consulta de Medicina Dentária merecem algumas precauções: elevadas quantidades de adrenalina, por exemplo, podem antagonizar os efeitos da insulina e culminar em hiperglicemia; pequenas quantidades de corticosteróides sistémicos podem condicionar o grau de

controlo metabólico. Por outro lado, o ácido acetilsalicílico, os antidepressivos e algumas categorias de antibióticos podem contribuir para episódios de hipoglicemia⁹⁶⁴.

Ainda de acordo com alguns autores o tratamento ortodôntico deve ser evitado nos casos de mau controlo metabólico da DM atendendo ao risco acrescido de patologia periodontal. Os pacientes diabéticos devem, no geral, ser alertados para esta propensão desde o início do tratamento ortodôntico, sobretudo se este implicar aparatologia fixa e períodos de intervenção mais prolongados, reforçando o cumprimento das indicações relativas à higiene oral^{964, 1068-1070} *cit in* ¹⁰⁷¹. Importa igualmente referir que possíveis alterações na “maturação” esquelética destas crianças obrigam a um plano de tratamento diferenciado^{1072, 1073}.

Estudo clínico

Sumário do Capítulo II

1. Introdução e Objetivos
2. Materiais e Métodos
 - 2.1 Generalidades
 - 2.1.1 Seleção da amostra
 - 2.1.2 Determinação das variáveis
 - 2.2 Exame clínico oral
 - 2.2.1 Examinador
 - 2.3 Recolha de dados, registo e índices adoptados
 - 2.3.1 Recolha de dados
 - 2.3.2 Registo de dados e critérios adoptados
 - 2.4 Caracterização salivar
 - 2.4.1 Colheita salivar
 - 2.4.2 Determinação da capacidade tampão salivar
 - 2.5 Caracterização microbiológica
 - 2.5.1 Colheita de amostras da mucosa e caracterização das leveduras
 - 2.5.2 Determinação da composição bacteriana salivar
 - 2.6 Caracterização imunológica
 - 2.7 Caracterização metabolómica
 - 2.8 Índices adoptados
 - 2.9 Análise estatística
 - 2.10 Fluxograma cronológico
 - 2.11 Organograma geral dos materiais e métodos
3. Resultados
 - 3.1 Análise descritiva
 - 3.1.1 Caracterização sociodemográfica e comportamental da amostra
 - 3.1.2 Caracterização da amostra por prevalência de patologias orais
 - 3.1.3 Caracterização microbiológica da amostra
 - 3.1.4 Identificação e quantificação de metabolitos salivares
 - 3.1.5 Caracterização da componente inflamatória salivar
 - 3.2 Análise inferencial
 - 3.2.1 Questão 1: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações de saúde oral?
 - 3.2.2 Questão 2: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros microbiológicos orais?
 - 3.2.3 Questão 3: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações do perfil metabolómico salivar?
 - 3.2.4 Questão 4: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros imunoinflamatórios salivares?
 - 3.2.5 Questão 5: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos potenciais fatores de risco ambientais/comportamentais e/ou fisiológicos para o desenvolvimento de patologia oral?

4. Discussão
 - 4.1 Análise global dos resultados
 - 4.2 Avaliação crítica da metodologia de estudo
5. Conclusões

II – Estudo clínico

A componente de investigação desta dissertação compreendeu um estudo clínico observacional do tipo analítico e transversal (seccional cruzado) visando uma amostra composta por crianças diabéticas tipo I e não diabéticas saudáveis.

I. Introdução e objetivos

Reconhecida a pertinência do tema e definido o respetivo enquadramento teórico verifica-se que algumas questões cruciais se mantêm totalmente em aberto. As particularidades inerentes a muitos dos processos fisiopatológicos das crianças continuam por esclarecer; este facto é absolutamente transponível, quer para a DM tipo I *per se*, quer para as diferentes patologias orais que, com maior ou menor frequência, lhes são diagnosticadas, isoladamente ou por mútua influência.

Um conhecimento aprofundado e conciso dos mecanismos de base que condicionam o surgimento, gravidade e evolução de ambos os tipos de patologias poderá proporcionar mais-valias importantes no campo da investigação, prevenção, diagnóstico e terapêutica das mesmas. Para este conhecimento pode contribuir a aplicação de técnicas analíticas cada vez mais precisas, menos invasivas e advindas de áreas tecnológicas diferenciadas e distintas, tornando viável uma multiparametrização relevante de aspectos biológicos e fisiológicos. Esta abordagem é particularmente válida e justificada na cavidade oral.

Desta forma, o presente estudo clínico foi idealizado tendo por base a reflexão sobre algumas das questões eminentemente relacionadas com as eventuais repercussões da DM tipo I na cavidade oral das crianças, mas objetivando igualmente a caracterização de vários parâmetros da doença, da própria cavidade oral e de aspectos comportamentais diferenciados.

Por conseguinte, puderam ser resumidos nas seguintes questões os objetivos principais que nortearam a realização deste trabalho em crianças:

Questão 1: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações de saúde oral?

Questão 2: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros microbiológicos orais?

Questão 3: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações do perfil metabólico salivar?

Questão 4: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros imunoinflamatórios salivares?

Questão 5: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos potenciais fatores de risco ambientais/comportamentais e/ou fisiológicos para o desenvolvimento de patologia oral?

Estas questões foram convertidas, em termos de metodologia de teste, nas seguintes hipóteses nulas:

H_{01} . Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações dos parâmetros de saúde oral.

H_{02} . Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações dos parâmetros microbiológicos orais.

H_03 . Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações do perfil metabólico salivar.

H_04 . Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações dos parâmetros imunoinflamatórios salivares.

H_05 . Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações dos potenciais fatores de risco ambientais/comportamentais e/ou fisiológicos para o desenvolvimento de patologia oral.

Para o efeito, além da comparação entre os dois grupos em estudo, crianças com e sem DM tipo I, avaliou-se também a existência de diferenças significativas entre alguns subgrupos estabelecidos na população em estudo: crianças diabéticas com adequado controlo metabólico vs crianças diabéticas com inadequado controlo metabólico; crianças diabéticas com adequado controlo metabólico vs crianças não diabéticas e crianças diabéticas com inadequado controlo metabólico vs crianças não diabéticas.

2. Materiais e métodos

2.1 Generalidades

2.1.1 Seleção da amostra

Este estudo avaliou uma população de crianças diabéticas tipo I da região centro de Portugal. Tendo por base uma técnica não probabilística intencional foi constituída uma amostra que incluiu crianças com diagnóstico comprovado de DM tipo I, sem qualquer outra patologia crónica relevante - “grupo de diabéticos” - e um grupo de controlo formado por crianças não diabéticas saudáveis, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 5 e os 15 anos (inclusive). Da amostra de crianças diabéticas tipo I fizeram parte todas as crianças e adolescentes consultados, durante o período de tempo estabelecido, na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Pediátrico de Coimbra, que cumprissem os critérios de inclusão e aceitassem participar no estudo. Das cerca de 200 crianças e adolescentes até aos 18 anos consultados, em média, anualmente, nesta unidade de saúde (que constitui, no Centro, a principal referência para o tratamento e monitorização da DM tipo I em regime periódico trimestral) foi possível englobar a totalidade dos que cumpriam os critérios de inclusão referidos, diagnosticados até à data de início do estudo, perfazendo um total de 133 crianças e adolescentes.

A amostra de crianças não diabéticas saudáveis foi selecionada, de forma aleatória e de acordo com os critérios de inclusão, durante idêntico período temporal, a partir dos frequentadores da consulta de Odontopediatria do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMUC, totalizando 72 crianças.

Excluíram-se todas as crianças cuja faixa etária não se encontrasse no intervalo pretendido, cujo diagnóstico não fosse o de DM tipo I (“grupo diabéticos”), usassem aparelho ortodôntico, tivessem sido submetidas a antibioterapia ou antimicrobianos orais nas duas semanas anteriores e ingerido alimentos nos 90-120 min anteriores à avaliação.

Todos os princípios éticos e legais foram respeitados, de acordo com os pressupostos explicitados na Declaração de Helsínquia, tendo sido obtido um consentimento informado por escrito para todas as crianças participantes (anexo 3), e a aprovação das Comissões de Ética das instituições envolvidas (anexos I a, b, c).

De Fevereiro de 2009 a Fevereiro de 2010 foram selecionados períodos temporais destinados à recolha dos dados das crianças, atendendo à disponibilidade e ao agendamento das suas consultas regulares e evitando, ao máximo, algum tipo de perturbação ao normal funcionamento destas. Por conseguinte, todas as observações, colheitas e registos decorreram em dias de consulta previamente agendados sem que, no entanto, os intervenientes tivessem tido conhecimento prévio dos objetivos do estudo. As crianças disponíveis para participar foram examinadas na presença dos respetivos tutores após verificação dos requisitos e explicação sumária do protocolo a desenvolver, tendo os últimos fornecido a maior parte das informações requeridas.

O estabelecimento da dimensão da amostra teve em conta o número de diabéticos tipo I, dos 5 aos 15 anos, seguidos na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Pediátrico de Coimbra tendo-se, neste caso, conforme referido, incluído a totalidade das crianças (n=133); quanto ao grupo de não diabéticos saudáveis, foi composto de 72 crianças, número definido por conveniência de acordo com o desenho do estudo e atendendo, simultaneamente, à prevalência “esperada” das diferentes

patologias orais em avaliação tendo por base os valores de referência nacionais publicados pela DGS em 2008 ¹⁰⁷⁴.

2.1.2 Determinação das variáveis

Através da base de dados elaborada foi possível obter tabelas de distribuição segundo os diferentes tipos de variáveis (anexo 5), cuja influência pode ser medida pela análise da variância. Nem toda a informação recolhida foi desenvolvida em termos de resultados atendendo ao seu grau de relevância e consistência.

2.2 Exame clínico oral

2.2.1 Examinador

Todos os dados foram colhidos por uma única examinadora, Médica Dentista, que, para além da observação, efetuou os registos e foi responsável por todos os requisitos materiais e técnicos.

Para evitar eventuais vieses por fadiga que pudessem conduzir a diagnósticos inconsistentes foi limitado o número de crianças observadas, não excedendo as 10-12 por sessão, despendendo-se, em média, 10-15 min por cada observação e registo.

Mesmo considerando a experiência clínica da examinadora, a sua participação prévia em estudos epidemiológicos, formação específica na área e tratando-se de uma observação com critérios e dados objectivos, foi realizada previamente uma calibração; assim, de forma complementar e totalmente aleatória, cerca de 10% (n=20) da amostra foi reexaminada num intervalo de tempo não superior a um mês, testando-se a reprodutibilidade intraexaminador. Esta duplicação de observações foi igualmente acompanhada de colheita de amostras e respectiva análise, contribuindo para a aferição das técnicas laboratoriais empregues.

2.3 Recolha de dados, registo e índices adotados

2.3.1 Recolha de dados

Toda a recolha de dados referentes aos diabéticos tipo I decorreu nos gabinetes da respetiva consulta, gentilmente disponibilizados para o efeito; as crianças foram sentadas numa cadeira, voltadas para a janela, a uma distância inferior a dois metros desta, sem incidência direta da luz solar e com auxílio de fonte de luz padronizada, sempre que requerido. O exame das estruturas orais foi conduzido sistematicamente sem que previamente tivesse existido qualquer processo “profissional” de limpeza, secagem ou isolamento; apenas foi pedido que a criança bochechasse “levemente” com água. Sempre que justificado foram utilizados, na remoção de eventuais depósitos moles sobre a superfície dentária, rolos de algodão, gaze e fio dentário. A examinadora posicionou-se de modo a que os seus olhos se encontrassem ao nível da boca da criança, sentada à sua frente, com uma mesa de apoio que permitia o registo da observação, mas também a organização de todo o restante material necessário. As acentuadas limitações físicas e a dependência da dinâmica da própria consulta de Endocrinologia Pediátrica não

permitiram qualquer outro tipo de abordagem alternativa eventualmente preconizada para uma mais adequada observação das estruturas orais.

As crianças do grupo “não diabéticos” foram observadas na consulta de Odontopediatria, na clínica da Área de Medicina Dentária da FMUC, imediatamente antes do início da mesma; apesar de sentadas no equipamento dentário, nas observações e colheitas não foi utilizada qualquer funcionalidade deste tentando-se, inclusivamente, que a fonte de luz natural estivesse a uma distância semelhante à cumprida para o grupo de diabéticos.

A cada criança (e respetivos cuidadores) foram explicadas, para além dos objetivos do estudo, as regras básicas de higiene oral e cuidados dietéticos, sublinhando-se a importância do acesso regular à consulta de Medicina Dentária; foi ainda cedido a cada criança material de higiene oral e uma brochura alusiva ao tema.

Para a inspeção intraoral utilizou-se um espelho dentário plano nº4 (Hu-Friedy®), uma pinça, uma sonda exploradora reta de ponta arredondada CPI I.5B (Hu-Friedy®), luvas de látex, máscara de exame, fio dentário, gaze, rolos de algodão e copos de plástico descartáveis. Na realização dos testes salivares CRT® bacteria e CRT® buffer (Ivoclar Vivadent®, Schaan, Liechtenstein) aplicou-se o material contido nas embalagens disponibilizadas pelo fabricante nomeadamente, frascos-teste com tubo de ensaio de superfície ágar azul e brilhante, comprimidos de NaHCO₃, pipeta, tira identificadora de pH, cubo de parafina, seringa descartável, cronómetro e estufa.

Todo o material utilizado foi transportado para tratamento de esterilização em recipientes adequados, propositadamente adquiridos, não havendo necessidade de reutilização imediata visto estar acautelada a quantidade suficiente para cada sessão de observações.

As amostras biológicas (saliva/mucosa) foram devidamente acondicionadas e mantidas em gelo por curtos períodos de tempo até ao tratamento laboratorial adequado.

2.3.2 Registo de dados e critérios adotados

Foi desenvolvido um formulário de registo (anexo 4), individualmente aplicado e adaptado aos objetivos da investigação, tendo por base os documentos disponibilizados pela OMS e, mais recentemente, o ICDAS-II; os dados recolhidos visaram informações de índole geral, demográficas, relativas à DM (se aplicável), história médica pregressa, hábitos alimentares, higiénicos, condição dentária, periodontal, mucosa (sumária) e caracterização salivar em diferentes vertentes.

Em relação à DM foram indagados aspectos correlacionados com a duração da doença (anos decorridos desde o diagnóstico), idade de diagnóstico e dados laboratoriais referentes ao grau de controlo metabólico da mesma com base no valor percentual de HbA_{1c} (Siemens/Bayer DCA 2000+ Analyser). O grupo de diabéticos foi, sempre que adequado em termos de análise, subagrupado de acordo com este mesmo valor em “metabolicamente controlados” (HbA_{1c} ≤7,5%) e “metabolicamente não controlados” (HbA_{1c} >7,5)^{159, 172}. Por outro lado, em relação à duração da doença, foram subdiferenciados dois grupos, conforme o diagnóstico da DM tivesse ocorrido há mais ou menos de 5 anos.

No registo de cárie dentária, e de acordo com o referido no capítulo anterior (ver 1.4.1), foi empregue parte da metodologia adotada pelo EGOHID, nomeadamente o ICDAS-II⁴⁸⁹. Este método tem por base um sistema de registo de dois dígitos: o primeiro dígito refere-se à presença ou ausência

de restaurações e selantes de fissuras; o segundo refere-se à presença ou ausência de lesões coronárias de cárie dentária. A única exceção apresenta-se quando se utiliza o código P (tabela I).

Tabela I. Classificação das superfícies, de acordo com o ICDAS-II, relativamente à presença de restaurações e selantes de fissuras, eventuais lesões de cárie e perdas dentárias.

	Restaurações e selantes	Lesões de cárie dentária	Dentes ausentes
0	Não selado nem restaurado	Superfície dentária sã	-
1	Parcialmente selado	1 ^ª s alterações no esmalte visíveis após secagem prolongada e/ou alterações de coloração limitadas ou confinadas aos sulcos e fissuras	-
2	Totalmente selado	Alterações marcadas no esmalte visíveis quando húmido, e/ou alterações de coloração para além da região dos sulcos e fissuras	-
3	Restauração estética	Descontinuidade do esmalte, sem dentina visível	-
4	Restauração a amálgama	Lesão de cárie dentinária – visível sombra cinzenta sob o esmalte	-
5	Coroa metálica	Cavidade distinta com dentina visível	-
6	Coroa em porcelana, ouro ou faceta	Cavidade distinta extensa com dentina visível	-
7	Restauração perdida ou fracturada	-	-
8	Restauração temporária	-	-
97	-	-	Dente extraído por cárie
98	-	-	Dente em falta por outros motivos
99	-	-	Dente não erupcionado
P	-	-	Dente em falta substituído por implante/póntico

A informação foi colhida para cada uma das superfícies dentárias, e separadamente para sulcos e fissuras vestibulares e linguais. Uma vez que se revelou extremamente difícil codificar lesões iniciais, dificuldade esta sentida por vários outros autores, e tendo em conta as limitadas condições físicas, apenas se registaram lesões a partir do estágio 2 [variante Epi_{A(0+1)}, usada em estudos de campo]; para possibilitar a posterior comparação com os estudos convencionais de cárie dentária apenas se consideraram, no cálculo dos índices cpo e CPO, lesões em dentina (D3), de acordo com o registo em quatro níveis originalmente preconizado pela OMS em 1979^{485, 488, 489, 1075, 1076}.

Não foi executado, quer por ausência de meios técnicos disponíveis, quer por não ser considerado essencial pela OMS neste tipo de investigação epidemiológica, qualquer exame imagiológico¹⁰⁷⁷.

Relativamente à condição periodontal apenas foi realizada uma avaliação por sondagem, igualmente sumária, registando a presença ou ausência de hemorragia gengival em localizações dentárias específicas (4 pontos das superfícies vestibular e lingual - mesiovestibular, distovestibular, mesiolingual, distolingual) dos dentes 11, 21, 31, 41, 16, 26, 36, 46, sempre que presentes e totalmente erupcionados (face oclusal ou bordo incisal ao nível do plano oclusal). Excluíram-se as crianças em fase de dentição temporária e não se avaliou a presença de bolsas periodontais.

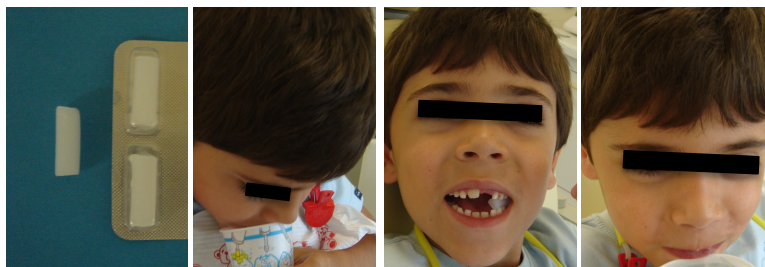
O exame às estruturas orais restantes efetuou-se, tanto quanto possível, de acordo com as premissas definidas pela OMS¹⁰⁷⁷. Observaram-se eventuais patologias nos tecidos moles (ex. lesões

aftosas/ulcerativas, fístulas, abscessos, leucoplasias, eritroplasias, candidíase, língua geográfica, hipertrofia parotídea) e duros (pigmentação negra extrínseca, hipoplasias de esmalte, alterações de forma, número, má-oclusão); sempre que justificado procedeu-se a registo fotográfico, confirmação de diagnóstico e encaminhamento para resolução clínica.

2.4 Caracterização salivar

2.4.1 Colheita salivar

Foi efetuado um esforço logístico para que as colheitas de saliva decorressem em períodos do dia semelhantes, embora isso nem sempre tenha sido exequível dada a tentativa de não interferir com o normal decurso das consultas programadas. Da saliva estimulada, recolhida durante 3-5 minutos (min) pela técnica de cuspir após mastigação de um estimulante (cubo de parafina) (CRT® Bactéria, Ivoclar Vivadent®, Schaan, Liechtenstein) (Figuras 2-5), foi rejeitada a porção inicial (de grande variação em termos de composição), armazenando-se a restante em recipientes adequados do tipo *Eppendorf* (Eppendorf, Hamburg, Germany); uma vez contabilizados o tempo efetivo de recolha e respectiva quantidade foi possível determinar, de forma aproximada, em mL/min, o fluxo salivar. Através dos valores obtidos efetuou-se uma dicotomização da amostra subagrupando-se as crianças/adolescentes com fluxo muito baixo ($<1,0$ mL/min) e com fluxo considerado normal ($\geq 1,0$ mL/min)^{405, 556, 846, 952}.



Figuras 2-5. Ilustração da técnica de colheita das amostras salivares.

As mesmas amostras foram sequencialmente preservadas a cerca de $+4$ °C e/ou -20 °C/ -80 °C, em azoto líquido e/ou adicionando-se lhas azida sódica (NaN_3), segundo as exigências impostas pelas diferentes técnicas analíticas posteriormente empregues⁸³³.

2.4.2 Determinação da capacidade tampão salivar

A determinação da capacidade tampão salivar foi executada com recurso a tiras de teste (CRT® Buffer, Ivoclar Vivadent®, Schaan, Liechtenstein), de acordo com as normas do fabricante. Com base no código colorimétrico disponibilizado (Figura 6) foi possível identificar amostras salivares com elevada capacidade tampão ($\text{pH} \geq 5.5$, aproximadamente), média capacidade tampão ($\text{pH} 4.5 - 5.5$) ou baixa capacidade tampão ($\text{pH} \leq 4.5$)¹⁰⁷⁸.

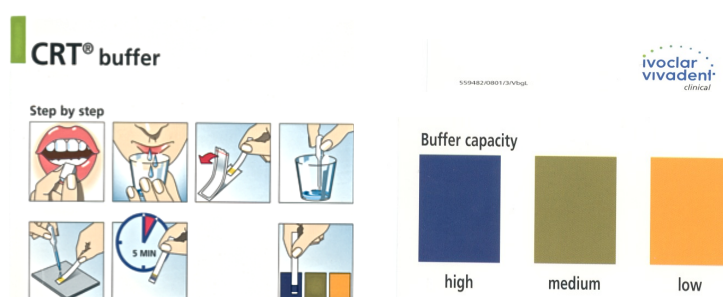


Figura 6. Ilustração disponibilizada pelo fabricante com as instruções para determinação da capacidade tampão salivar com recurso a tiras de teste (CRT® Buffer; Ivoclar Vivadent®, Schaan, Liechtenstein).

2.5 Caracterização microbiológica

2.5.1 Colheita de amostras da mucosa e caracterização das leveduras

Para a obtenção das amostras de esfregaço de mucosa (prévia à obtenção de saliva) as crianças foram instruídas a bochechar levemente a boca com água e empregou-se a técnica de esfregaço por zaragatoa (*swab*) abrangendo, de forma padronizada, diferentes zonas da mucosa oral, conforme descrito por Kleinegger *et al.*, 1996 e Kadir *et al.*, 2005^{742, 745}. Após acondicionamento e armazenamento adequados as amostras foram analisadas em termos de composição e identificação de espécies (tipificação).

A identificação por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região 5.8S ITS foi levada a cabo segundo o procedimento descrito por Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999¹⁰⁷⁹. A amplificação do segmento 5.8S ITS foi feita por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), usando como molde uma colónia da levedura a identificar. Da mistura de reação fizeram parte um tampão NH_3 , 2,5 μM de MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 1 μM de cada oligonucleótido, 5 U de Taq, em 100 μL de volume final. Considerou-se que o volume de uma colónia fosse de aproximadamente 4 μL . Esta foi recolhida com um palito estéril e ressuspensa na mistura final, já no tubo de PCR. O esquema térmico foi o mesmo da PCR da região D1/D2. A sequência dos oligonucleótidos iniciadores *forward* e *reverse* considerada foi, respectivamente: ITS-1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' e ITS-4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'¹⁰⁸⁰. O sucesso da amplificação foi verificado por electroforese em gel de agarose a 1%. Nos casos em que não se obteve amplificado repetiu-se a PCR usando como molde DNA extraído pelo método do isopropanol.

Para a análise RFLP o produto de PCR foi dividido em três partes de 15 μL para se proceder à digestão com três enzimas de restrição: Cfo I, Hae III e Hinf I (Bioron); a esse volume de DNA foram adicionados 2 μL de água milliQ estéril, 2 μL de tampão correspondente e 10 unidades de enzima, perfazendo um volume de 20 μL . Esta mistura de reação foi incubada durante 15 horas, a 37°C. Os fragmentos de restrição foram depois separados num gel de agarose a 3%, tendo sido igualmente aplicado um padrão de pesos moleculares de DNA (100bp Molecular Ruler; BioRad). O gel foi fotografado usando o sistema VersaDoc™ Imaging System (Biorad) e os tamanhos das bandas

quantificados usando o software Quantity One® I-D (Biorad). O padrão de bandas obtido foi depois comparado com uma base de dados construída por Esteve-Zarzoso *et al.*, em 1999, e disponível em <http://motor.edinfo.es/iata/>¹⁰⁷⁹. Esta base, por conter os padrões de restrição característicos de 300 espécies de leveduras, permite a sua identificação (anexo 6). As leveduras foram colocadas em 0,5 mL de meio desprovido de glucose (1% peptona e 1% extracto de levedura), em criotubos estéreis de tampa de rosca (CryoPure tube, Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Antes do congelamento as amostras foi-lhes adicionado 0,5 mL de uma solução de glicerol a 50%. Cada levedura foi guardada, em quadruplicado, a - 80° C.



Figuras 7-13. Ilustração de alguns dos passos referentes à colheita dos dois tipos de amostras biológicas (saliva e mucosa) e posterior caracterização do padrão de colonização por leveduras (carga e biodiversidade).

2.5.2 Determinação da composição bacteriana salivar

Na caracterização das colónias bacterianas de *S. mutans* e *Lactobacillus* foram utilizados os kits CRT® bactéria (Ivoclar Vivadent®, Schaan, Liechtenstein), aplicados à saliva estimulada; trata-se de um meio de cultura seletivo que permite determinar a quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus* presentes na saliva, constituído por um tubo de ensaio cujo interior possui duas superfícies: uma com agar brilhante para os *Lactobacillus* e outra com ágar azul para o *S. mutans* (Figura 14). Uma vez concluída a colheita de cada amostra salivar foi removido o porta-agar do fundo do frasco-teste e colocado o comprimido de NaHCO₃ (tampão). Eliminaram-se as proteções das duas superfícies de ágar, posteriormente humedecidas com a saliva, mantendo o porta-agar em posição oblíqua. Após a eliminação dos excessos o frasco-teste foi colocado na incubadora, adequadamente encerrado em posição vertical e mantido à temperatura de 37°C por 48 horas. Após cultura, os resultados foram divididos de acordo com as respectivas figuras de avaliação, tendo por base os valores de UFC/mL saliva.

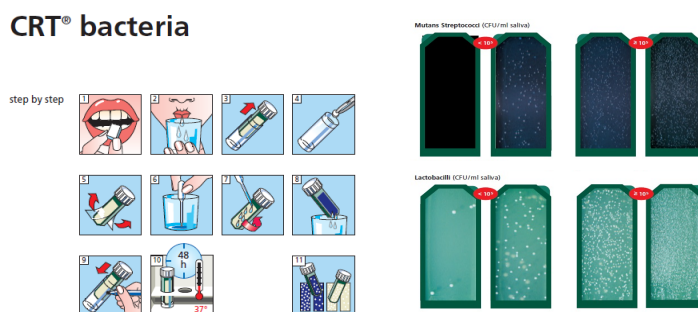
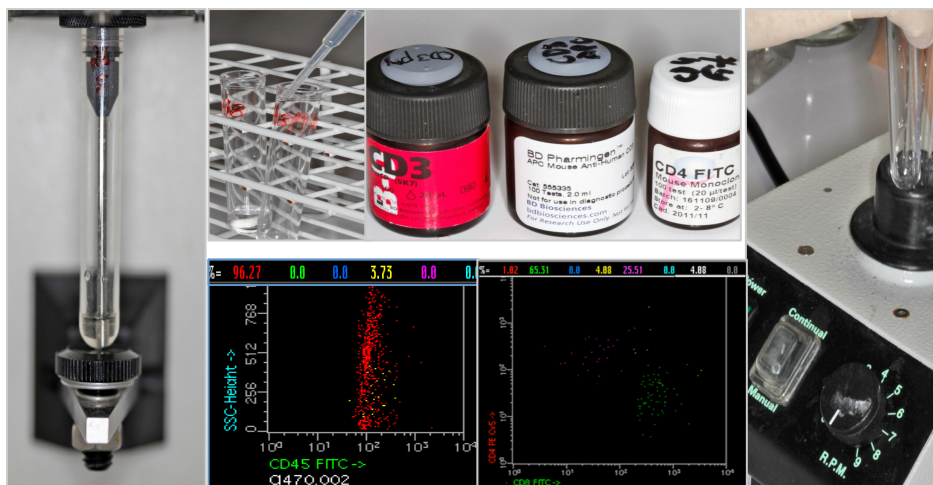


Figura 14. Ilustração disponibilizada pelo fabricante de alguns dos passos referentes à colheita de saliva estimulada e posterior caracterização do padrão de colonização bacteriológica (*S. mutans* e *Lactobacillus*) utilizando o teste CRT® bactéria (Ivoclar Vivadent®, Schaan, Liechtenstein).

2.6 Caracterização imunológica salivar

O estudo das populações e subpopulações celulares salivares previamente selecionadas foi efetuado por citometria de fluxo, para a qual se utilizaram 200 μL de saliva por cada tubo a marcar. De seguida foi adicionado tampão PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e centrifugados os tubos 1000 \times g durante 10 minutos. No seguimento desta lavagem, verteu-se o sobrenadante, ficando o *pellet*, e procedeu-se à marcação das populações celulares. Para esse fim foram utilizados os anticorpos monoclonais *mouse anti-human* CD3 (BD Pharmingen, San Jose, USA), CD4 (Immunostep, Salamanca, Espanha), CD8 (BDBiosciences, San Jose, CA, USA), CD14 (Immunotech, Marseille, França) e CD45 (BD Pharmingen, San Jose, USA). As fluorescências usadas foram FITC - *Fluoresceín IsoThiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína), PE - *PhycoErythrin* (ficoeritrina), PeCy5 - *PhycoErythrin Cyanine 5* (ficoeritrina-cianina 5), PerCP- *Peridinin Chlorophyll Protein* (proteína clorofila peridina) e APC - *AlloPhycoCyanine* (alofiocianina). A marcação ocorreu no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Após a incubação com os anticorpos monoclonais, procedeu-se à lise (para o caso de existirem eritrócitos) usando 2 mL de solução de lise (BD FACSTM lysing solution, BDBiosciences, San Jose, CA, USA), durante 10 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. De seguida, efetuou-se uma centrifugação, 5 minutos a 450 \times g, e verteu-se o sobrenadante. Seguiu-se uma lavagem com 2 mL de PBS, com nova centrifugação, 5 minutos a 450 \times g. Ressuspenderam-se as células com 500 μL de PBS e fez-se a leitura no citómetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences, San José, CA, USA), usando o *software* de aquisição BD CellQuest™ (BD Biosciences, San José, CA, USA), adquirindo 10.000 eventos. Os dados foram guardados e analisados posteriormente recorrendo-se ao programa de análise Paint-A-Gate™ (BD Biosciences, San José, CA, USA), o qual permitiu identificar as populações e subpopulações celulares. Nas figuras 15-20 encontram-se representados alguns destes procedimentos



Figuras 15-20. Ilustração de alguns dos passos das técnicas de colheita, preparação e análise por citometria de fluxo das amostras salivares. Dot plots obtidas através de citometria de fluxo salivar ilustrando gates representativas das subpopulações linfocitárias: os pontos vermelhos e amarelos correspondem aos CD3+/CD4+, os pontos amarelos correspondem aos CD3+/CD8+ e os pontos verdes correspondem aos CD45+/CD14+; os pontos violeta correspondem aos CD3+/CD4+ e os pontos verdes correspondem aos CD8+ não CD3+.

2.7 Caracterização metabólica salivar

A caracterização metabólica da saliva foi efectuada por Ressonância Magnética Nuclear de protão (^1H -RMN). Para o efeito foram usadas amostras de 160 μL de saliva aos quais foram adicionados 40 μL de um padrão de fumarato de sódio (10 mM, D_2O 99.9%) em tampão fosfato, contendo azida sódica (NaN_3). Espectros de ^1H -RMN de saliva foram adquiridos num espectrómetro RMN Varian VNMRS 14.1 Tesla (599.72 MHz) utilizando uma sonda de detecção indireta de dupla ressonância (H,X). Os parâmetros de aquisição incluíram um pulso de radiofrequências equivalente a 45° , um tempo de aquisição de 3 segundos, correspondendo a 18k pontos cobrindo uma largura espectral de 6000 Hz, uma presaturação de solvente (H_2O) com a duração de 3 segundos e um tempo de repetição interpulsos de 12 segundos. Estes parâmetros possibilitam a aquisição de espectros de protão quantitativos pois o tempo de espera permite uma completa relaxação nuclear de todos os núcleos de hidrogénio em todos os metabolitos. A análise espectral consistiu, inicialmente, na comparação das alturas das ressonâncias relativas a cada metabolito presente em níveis detectáveis. Numa etapa posterior foi também realizada a análise dos integrais das ressonâncias de metabolitos que apresentavam maior variabilidade inter-amostras. Antes da transformação de Fourier cada espectro foi sujeito a uma apodização para melhoria da razão sinal/ruído mediante a multiplicação do FID (*Free Induction Decay*) por uma Lorentziana de 0.2 Hz.

Para a análise preliminar utilizaram-se as alturas de 60 ressonâncias e aplicou-se uma análise de componentes principais (PCA), com uma matriz de correlação de Spearman para um intervalo de confiança de 95%. Esta análise multivariada permitiu reduzir a dimensão dos dados a vectores ortogonais e, sendo esta uma “*blind analysis*”, foi possível seleccionar oito metabolitos que apresentavam as maiores variâncias, nomeadamente: acetato, alanina, butirato, etanol, formato, lactato, malato e propionato. Estes metabolitos foram então sujeitos à análise dos integrais para calcular, de forma quantitativa a concentração de cada um, utilizando o sistema de deconvolução espectral do programa Nuts^{Pro} (Acom

NMR Inc., Livermore, Califórnia, USA). Para o cálculo da concentração integrou-se a área do padrão e normalizaram-se os valores para a massa e número de protões.



Figuras 21-29. Ilustração de alguns dos passos das técnicas de preparação e análise das amostras salivares por ¹H-RMN.

2.8 Outros índices adotados

A prevalência das patologias orais determinou-se com base no exame clínico e foi expressa em percentagem; adicionalmente foi efetuado o cálculo dos índices CPO, cpo e SiC, já descritos anteriormente (ver 1.4.1).

A biodiversidade das espécies de *Candida* foi avaliada pelo aplicação do índice de Simpson (IS), originalmente derivado e descrito atribuindo ao valor zero a maior diversidade e ao valor 1 a existência de apenas de uma espécie¹⁰⁸¹. No entanto, tendo em conta que esta escala é menos intuitiva do que a sua inversa, isto é, considerar o valor zero associado à inexistência de biodiversidade e o valor 1 ao máximo de biodiversidade, tem sido apresentado na literatura o índice de Simpson desta última forma¹⁰⁸². Na prática, determina-se o valor 1-IS para o valor do índice e o intervalo de confiança é alterado em conformidade.

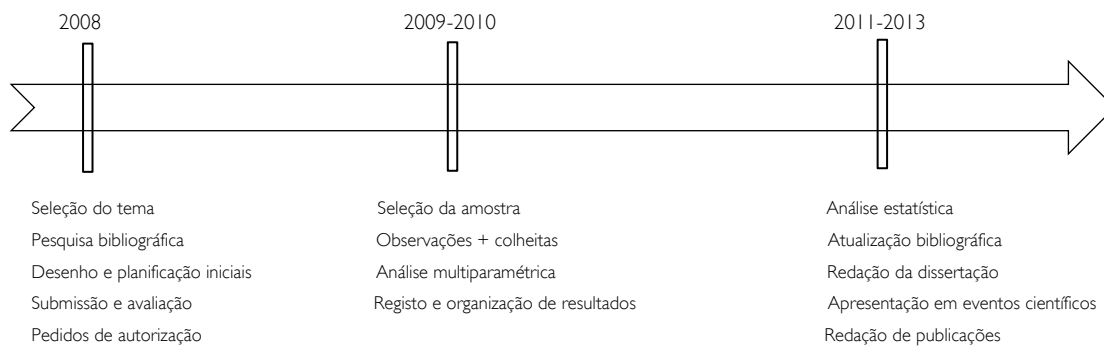
Relativamente à reprodutibilidade das observações, a natureza do problema de concordância não permitiu a aplicação direta da estatística Kappa de Cohen - $K=(Pobs - Pesp)/(1 - Pesp)$; no entanto foi possível calcular uma estimativa desse valor, considerando-se existir concordância para um dado indivíduo quando o diagnóstico de todos os dentes, realizado em duas observações distintas, tiver sido coincidente. Apesar do diagnóstico, dente a dente, apresentar inúmeras possibilidades, assumiu-se uma simplificação apenas para duas situações possíveis com uma probabilidade de acerto no diagnóstico de 0.5. Considerando uma média de 26 dentes para observar, tem-se que a probabilidade de acerto em todos eles é de 1.5E-8. Este valor constituiu a concordância esperada (Pesp) necessária ao cálculo da estatística de Kappa.

2.9 Análise estatística

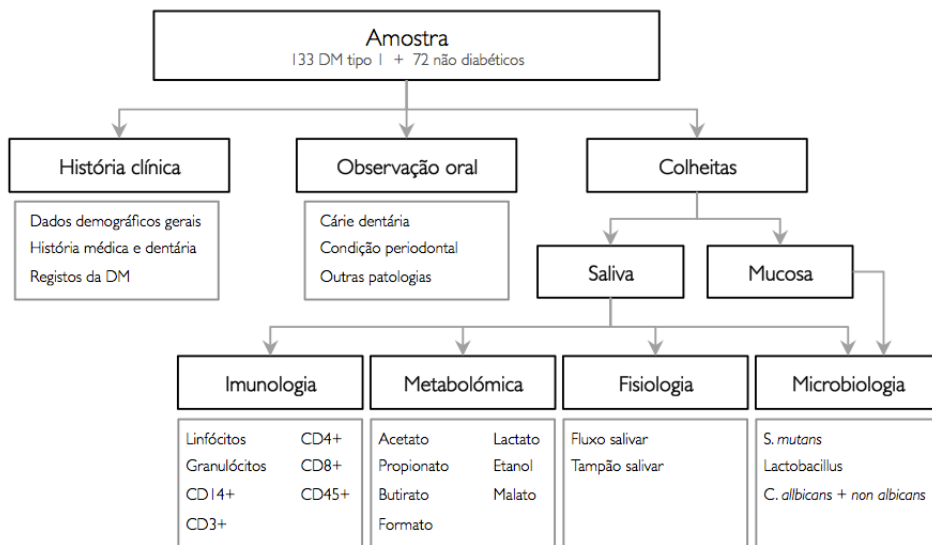
Todas as variáveis em estudo foram inicialmente registadas de forma definitiva num ficheiro de Microsoft Office Excel® (versão 2010, Microsoft Corporation) e, numa fase posterior, estatisticamente analisadas através do *software Statistical Package for the Social Sciences* (versão 19.0, IBM, SPSS Statistics). A grande maioria dos valores foram, em termos descritivos, expressos por médias±desvios-padrão (dp). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para um IC de 95%. Os diferentes grupos avaliados foram comparados e verificada a existência de diferenças/correlações através da aplicação dos seguintes testes: Kruskal-Wallis, Chi-quadrado (χ^2), Mann-Whitney, t de Student, exato de Fisher e coeficiente de Spearman. Foi ainda efectuado, sempre que justificável, o cálculo do *odds ratio* (OR) como medida de intensidade de associação.

2.10 Fluxograma cronológico

Em sùmula é apresentada a sequéncia das diferentes fases do trabalho distribuídas no tempo:



2.11 Organograma geral dos materiais e métodos



3. Resultados

A apresentação dos resultados, expressos em tabelas, gráficos e imagens, compreenderá duas partes distintas referentes às componentes descritiva e inferencial.

3.1 Análise descritiva

Genericamente os resultados de cada parâmetro de avaliação serão apresentados, conforme mencionado, em tabelas e gráficos nos quais constarão os valores de frequência absoluta e relativa (n/%) de acordo com os subgrupos (definidos no desenho do estudo) referentes à condição clínica: não diabéticos saudáveis (grupo de controlo), diabéticos metabolicamente controlados ($HbA_{1c} \leq 7,5$) e não controlados ($HbA_{1c} > 7,5$).

A consistência das observações e registos, avaliada em cerca de 10% da amostra (20 crianças), foi elevada; a concordância observada (Pobs) foi de 0,90 (valor $K=0,90$).

3.1.1 Caracterização sociodemográfica e comportamental da amostra

Tabela II. Caracterização sociodemográfica da amostra (n=205).

Dimensão		Não diabéticos	Diabéticos	$HbA_{1c} \leq 7,5$	$HbA_{1c} > 7,5$
Média de idade (anos)		10,19 ($\pm 2,75$)	11,10 ($\pm 3,11$)	10,47 ($\pm 3,08$)	11,42 ($\pm 3,09$)
Grupos etários	5-11	49 (68,1)	60 (45,1)	25 (55,6)	35 (39,8)
	12-15	23 (31,9)	73 (54,9)	20 (44,4)	53 (60,2)
Género	♂	48 (66,7)	69 (51,9)	24 (53,3)	45 (51,1)
	♀	24 (33,3)	64 (48,1)	21 (46,7)	43 (48,9)
Residência	Rural	55 (76,4)	91 (68,4)	28 (62,2)	63 (71,6)
	Urbana	17 (23,6)	42 (31,6)	17 (37,8)	25 (28,4)
Formação superior dos progenitores	Ambos sem	61 (84,7)	99 (74,4)	24 (53,3)	75 (85,2)
	Ambos com	5 (6,9)	15 (11,3)	9 (20,0)	6 (6,8)
	Apenas mãe com	6 (8,3)	15 (11,3)	9 (20,0)	6 (6,8)
	Apenas pai com	0 (0,0)	4 (3,0)	3 (6,7)	1 (1,1)

Tabela III. Caracterização comportamental geral da amostra.

		Não diabéticos	Diabéticos	$HbA_{1c} \leq 7,5$	$HbA_{1c} > 7,5$
Frequência de escovagem dentária	Não escova	3 (4,2)	13 (9,8)	1 (1,6)	12 (16,7)
	1x/dia	41 (56,9)	58 (43,6)	27 (44,3)	31 (43,1)
	2x/dia	27 (37,5)	52 (39,1)	29 (47,5)	23 (31,9)
	> 2x/dia	1 (1,4)	10 (7,5)	4 (6,6)	6 (8,3)
Utilização do fio dentário	Usa	7 (9,7)	18 (13,5)	9 (20,0)	9 (10,2)
	Não usa	65 (90,3)	115 (86,5)	36 (80,0)	79 (89,8)
Suplementos de fluoretos	Usa	9 (13,0)	10 (7,8)	4 (9,1)	6 (7,1)
	Já usou	33 (47,8)	92 (71,9)	30 (68,2)	62 (73,8)
	Nunca usou/ não sabe	27 (39,1)	26 (20,3)	10 (22,7)	16 (19,0)
Idade da 1ª consulta de MD	≤6 anos	31 (43,1)	43 (32,8)	17 (38,6)	26 (29,9)
	>6 anos	39 (54,2)	74 (56,5)	20 (45,5)	54 (62,1)
	Nunca foi/não sabe	2 (2,8)	14 (10,7)	7 (15,9)	7 (8,0)
Nº total de refeições diárias	≤5	51 (70,8)	37 (27,8)	13 (28,9)	24 (27,3)
	>5	21 (29,2)	96 (72,2)	32 (71,1)	64 (72,7)
Consumo de guloseimas	≤1x/ semana	34 (47,2)	87 (65,4)	33 (73,3)	54 (61,4)
	Até 3x/ semana	26 (36,1)	45 (33,8)	12 (26,7)	33 (37,5)
	Diariamente	12 (16,7)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,1)

A duração média da doença nas crianças diabéticas foi de $5,2 \pm 3,4$ anos e o valor médio percentual ($\pm dp$) da hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) $8,19 \pm 1,42$.

3.1.2 Caracterização da amostra por prevalência de patologias orais

Tabela IV. Caracterização geral da amostra relativamente à ocorrência de patologia oral.

		Não diabéticos	Diabéticos	$HbA_{1c} \leq 7,5$	$HbA_{1c} > 7,5$
CPO	0	27 (37,5)	45 (33,8)	25 (41,0)	20 (27,8)
	1-4	30 (41,6)	53 (39,8)	25 (41,0)	28 (38,9)
	>4	13 (18,1)	28 (21,1)	7 (11,5)	21 (29,2)
	Não aplicável	2 (2,8)	7 (5,3)	4 (6,6)	3 (4,2)
cpo	0	8 (11,1)	23 (17,3)	12 (19,7)	11 (15,3)
	1-4	25 (34,7)	31 (23,3)	16 (26,2)	15 (20,8)
	>4	19 (26,4)	8 (6,0)	6 (9,8)	2 (2,8)
	Não aplicável	20 (27,8)	71 (53,4)	27 (44,3)	44 (61,1)
Experiência de cárie	Ambas as dentições	29 (40,3)	18 (13,5)	10 (16,4)	8 (11,1)
	Apenas dentição decídua	17 (23,6)	24 (18,0)	14 (23,0)	10 (13,9)
	Apenas dentição permanente	17 (23,6)	60 (45,1)	21 (34,4)	39 (54,2)
Condição periodontal	Sãos	34 (47,2)	31 (23,3)	12 (26,7)	19 (21,6)
	Hemorragia à sondagem/ cálculos	36 (50,0)	93 (69,9)	29 (64,4)	64 (72,7)
	Não aplicável	2 (2,8)	9 (6,8)	4 (8,9)	5 (5,7)
Má oclusão	Sim	48 (66,7)	68 (51,1)	18 (40,0)	50 (56,8)
	Não	24 (33,3)	65 (48,9)	27 (60,0)	38 (43,2)
Outras lesões orais	Sem lesões	54 (75,0)	91 (68,4)	32 (71,1)	59 (65,3)
	Lesão aftosa	1 (1,4)	5 (3,8)	3 (6,7)	2 (2,3)
	Fístula	4 (5,6)	4 (3,0)	2 (4,4)	2 (2,3)
	Abcesso	4 (5,6)	4 (3,0)	1 (2,2)	3 (3,4)
	Pigmentação negra extrínseca	7 (9,7)	13 (2,3)	3 (6,7)	10 (11,4)
	Glossite rombóide mediana	0 (0,0)	3 (2,3)	1 (2,2)	2 (2,3)
	Língua geográfica	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,1)
	Hipoplasia de esmalte	1 (1,4)	11 (8,3)	3 (6,7)	8 (9,1)
Outras	1 (1,4)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,1)	
Fluxo salivar	Normal (≥ 1 mL/min)	61 (84,7)	109 (82,0)	39 (86,7)	70 (79,5)
	Baixo (< 1 mL/min)	10 (13,9)	23 (17,3)	6 (13,3)	17 (19,3)
	Sem saliva	1 (1,4)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,1)
Capacidade tampão salivar	Alta	43 (59,7)	96 (72,2)	36 (80,0)	60 (68,2)
	Média	22 (30,6)	25 (18,8)	8 (17,8)	17 (19,3)
	Baixa	6 (8,3)	11 (8,3)	1 (2,2)	10 (11,4)



Figuras 30-33 Ilustração de algumas das condições clínicas identificadas durante o exame das crianças em estudo, respectivamente: patologia periodontal; cárie dentária; glossite rombóide mediana e pigmentação negra extrínseca.

Tabela V/Gráfico 1. Caracterização das crianças integrantes da amostra total e por idades padrão (6,12 e 15 anos) com valores=0 para os índices CPO/cpo (n/percentagens calculadas em função do número de crianças ao qual foi possível aplicar os respetivos índices).

	Amostra total	6 anos	12 anos	15 anos
CPO e cpo=0	20 (17,5)	2 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
CPO=0	72 (36,7)	10 (100)	4 (16,7)	4 (14,8)
cpod=0	31 (27,2)	2 (15,3)	1 (20,0)	0 (0,0)

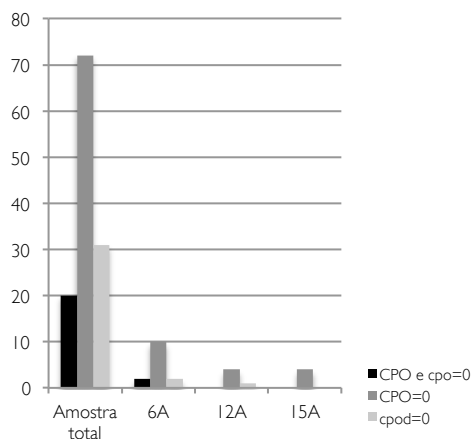
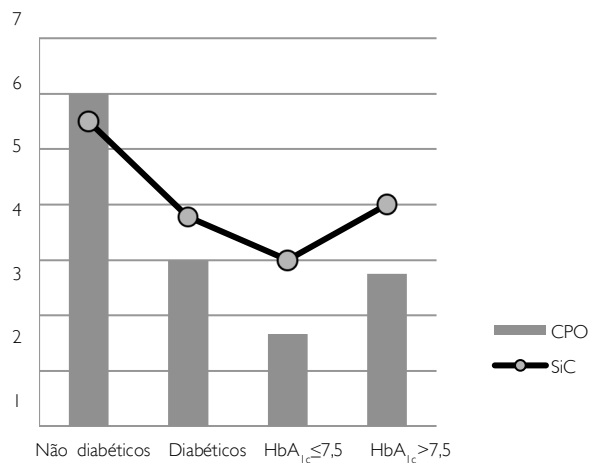


Tabela VI. Caracterização geral da distribuição de cárie dentária através dos índices CPO, cpo e SiC (se aplicável), por idades padrão

		Amostra total	Não diabéticos	Diabéticos	HbA _{1c} ≤7,5	HbA _{1c} >7,5
Amostra total	CPO	1,54±1,99	1,91±2,23	1,25±1,70	1,14±1,49	1,31±1,84
	cpo	2,70±2,42	3,52±2,53	1,79±1,90	2,29±2,61	1,47±1,57
6 anos	CPO	0,00*	0,00 *	0,00 *	- **	0,00 *
	cpo	3,30±2,26	4,17±2,23	2,00 ±1,83	- **	2,00±1,83
12 anos	CPO	4,20±1,92	6,00±1,41	3,00±1,00	1,67±1,37	2,75±2,14
	SiC	5,80±1,72	5,50±1,91	3,78±1,64	3,00± 0,00	4,00±1,83
15 anos	CPO	4,00±1,00	5,00±4,00	5,74±4,48	2,25±2,87	6,67±4,44

* Valor de CPO ** Sem casos

Gráfico 2. Caracterização geral da distribuição de cárie dentária através dos índices CPO e SiC aos 12 anos de acordo com a condição clínica.



De entre as crianças com evidência de cárie dentária, a percentagem com lesões em estádios D_{1+2} , D3 ou D4 (não cavitadas, atendendo aos critérios do ICDAS II) correspondeu, nas dentições temporária/definitiva, a respetivamente: a) não diabéticos 9%/13%; b) diabéticos 12%/8%.

3.1.3 Caracterização microbiológica da amostra

Foi caracterizada a colonização da cavidade oral (saliva e mucosa, quando aplicável) por leveduras e bactérias, de acordo com a presença, carga e biodiversidade, conforme descrito nas tabelas seguintes. Na alínea designada por “Sem registo” incluíram-se as situações nas quais não se obtiveram resultados por razões de ordem técnica.

Tabela VII. Presença de leveduras na saliva e mucosa.

	Não diabéticos	Diabéticos	HbA _{1c} ≤7,5	HbA _{1c} >7,5
Sem leveduras em simultâneo em ambos os tipos de amostras	27 (37,5)	55 (41,4)	19 (42,2)	36 (40,9)
Presente na saliva/ausente na mucosa	12 (16,7)	23 (17,3)	12 (26,7)	11 (12,5)
Presente na mucosa/ausente na saliva	2 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Presente em ambos	30 (41,7)	46 (34,6)	11 (24,4)	35 (39,8)
Presente na mucosa/sem saliva	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,1)
Ausente na mucosa/sem saliva	1 (1,4)	6 (4,5)	2 (4,4)	4 (4,5)
Sem registo simultâneo em ambos os tipos de amostras	0 (0,0)	2 (1,5)	1 (2,2)	1 (1,1)

Tabela VIII . Carga de leveduras na saliva e mucosa*.

	Não diabéticos		Diabéticos		HbA _{1c} ≤7,5		HbA _{1c} >7,5	
	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa
Sem leveduras	29 (40,3)	40 (55,6)	55 (41,4)	84 (63,2)	19 (42,4)	33 (73,3)	36 (40,9)	51 (58,0)
≤10	12 (16,7)	16 (20,2)	11 (8,3)	14 (10,5)	5 (11,1)	4 (8,9)	6 (6,8)	10 (11,45)
11-100	11 (15,3)	9 (12,5)	19 (14,3)	9 (6,8)	6 (13,3)	4 (8,9)	13 (14,8)	5 (5,7)
101-999	17 (23,6)	4 (5,6)	33 (24,8)	17 (12,8)	10 (22,2)	2 (4,4)	23 (26,1)	15 (17,0)
≥1000	2 (2,8)	1 (1,4)	4 (3,0)	3 (2,3)	1 (2,2)	0 (0,0)	3 (3,4)	3 (3,4)
Valor médio (±dp)	116,80±261,03	56,57±277,54	146,88±274,92	91,31±255,04	140,57±297,41	16,50±54,27	146,94±261,79	129,07±306,41
Sem saliva ou esfregaço	1 (1,4)	0 (0,0)	7 (5,3)	0 (0,0)	2 (4,4)	0 (0,0)	5 (5,7)	0 (0,0)
Sem registo	0 (0,0)	2 (2,8)	4 (3,0)	6 (4,5)	2 (4,4)	2(4,4)	2 (2,3)	4 (4,5)

* respetivamente UFC/mL ou UFC/esfregaço

Tabela IX . Número de espécies de leveduras na saliva e mucosa.

	Não diabéticos		Diabéticos		HbA _{1c} ≤7,5		HbA _{1c} >7,5	
	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa
Sem leveduras	29 (40,3)	40 (55,6)	55 (41,4)	84 (63,2)	19 (42,2)	33 (73,3)	36 (40,9)	51 (58,0)
Apenas 1 espécie	42 (58,3)	30 (41,7)	66 (49,6)	44 (33,1)	21 (46,7)	10 (22,2)	45 (51,1)	34 (38,6)
Mais do que 1 espécie	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem saliva ou esfregaço	1 (1,4)	0 (0,0)	7 (5,3)	0 (0,0)	2 (4,4)	0 (0,0)	5 (5,7)	0 (0,0)
Sem registo	0 (0,0)	2 (2,8)	4 (3,0)	6 (4,5)	2 (4,4)	2 (4,4)	2 (2,3)	4 (4,5)

Tabela X. Distribuição das diferentes espécies de leveduras na saliva e mucosa.

	Não diabéticos		Diabéticos		HbA _{1c} ≤7,5		HbA _{1c} >7,5	
	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa	Saliva	Mucosa
Sem leveduras	29 (40,3)	40 (55,6)	55 (41,4)	84 (63,2)	19 (42,2)	33 (73,3)	36 (40,9)	51 (58,0)
<i>C. albicans</i>	32 (44,4)	24 (33,3)	62 (46,6)	41 (30,8)	20 (44,4)	10 (22,2)	42 (47,7)	31 (35,2)
<i>C. railenensis</i>	0 (0,0)	2 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>C. guilliermondi</i>	3 (4,2)	2 (2,8)	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	2 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>S. cerevisiae</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	2 (1,5)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)	1 (1,1)	0 (0,0)
<i>H. burtonii</i>	0 (0,0)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>W. anomalus</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>T. delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)	0 (0,0)
<i>F. capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>F. capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>D. hansenii</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem saliva ou esfregaço	1 (1,4)	0 (0,0)	7 (5,3)	0 (0,0)	2 (4,4)	0 (0,0)	5 (5,7)	0 (0,0)
Sem registro	0 (0,0)	2 (2,8)	4 (3,0)	6 (4,5)	2 (4,4)	2 (4,4)	2 (2,3)	4 (4,5)

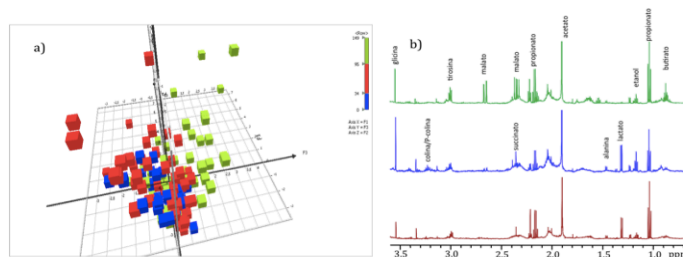
Tabela XI. Distribuição das espécies cariogénicas *S. mutans* e *Lactobacillus* na saliva.

	Não diabéticos	Diabéticos	HbA _{1c} ≤7,5	HbA _{1c} >7,5
<i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i> <10 ⁵ UFC/mL	24 (33,3)	60 (45,1)	25 (55,6)	35 (39,8)
<i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i> ≥10 ⁵ UFC/mL	27 (37,5)	41 (30,8)	12 (26,7)	29 (33,0)
<i>S. mutans</i> <10 ⁵ e <i>Lactobacillus</i> ≥10 ⁵ UFC/mL	14 (19,4)	16 (12,0)	4 (8,9)	12 (13,6)
<i>S. mutans</i> ≥10 ⁵ e <i>Lactobacillus</i> <10 ⁵ UFC/mL	6 (8,3)	9 (6,8)	2 (4,4)	7 (8,0)
Sem saliva	1 (1,4)	7 (5,3)	2 (4,4)	5 (5,7)

3.1.4 Identificação e quantificação de metabolitos salivares

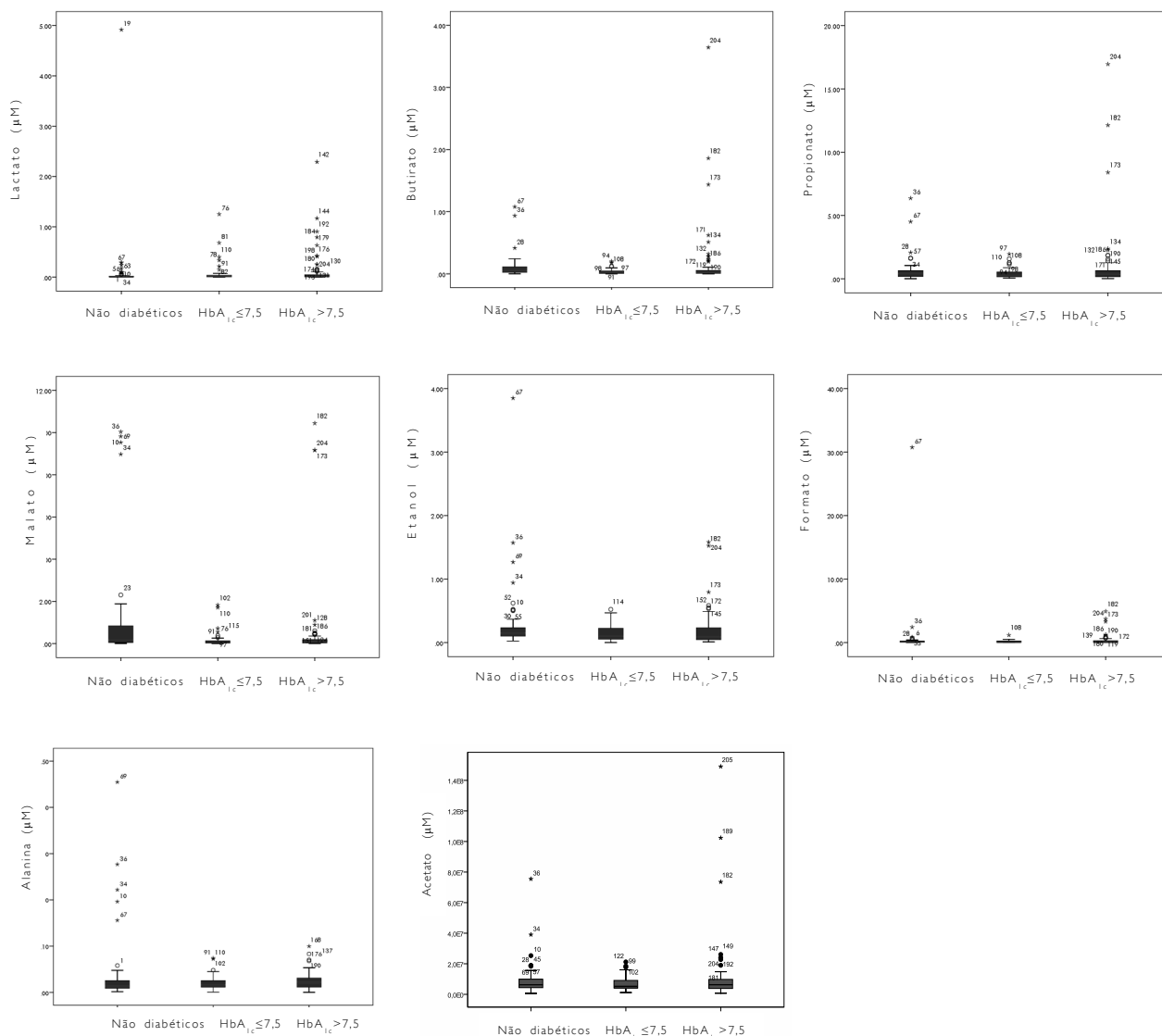
Tabela XII. Concentração média salivar dos diferentes metabolitos.

	Não diabéticos	Diabéticos	HbA _{1c} ≤ 7,5	HbA _{1c} > 7,5
Propionato (μM±dp)	0,5930±0,9256	0,7269±1,9333	0,4272±0,4202	0,8819±2,3521
Lactato (μM±dp)	0,0988±0,5831	0,0984±0,2791	0,0829±0,2177	0,1064±0,3069
Alanina (μM±dp)	0,0342±0,0698	0,0235±0,0171	0,0211±0,0155	0,0247±0,0178
Etanol (μM±dp)	0,2782±0,4997	0,1705±0,2238	0,1480±0,1264	0,1822±0,2603
Malato (μM±dp)	0,9418±2,1900	0,3691±1,4397	0,1800±0,3741	0,4669±1,7485
Butirato (μM±dp)	0,0994±0,1717	0,1037±0,3784	0,0413±0,0511	0,1360±0,4622
Acetato (μM±dp)	3,3165±4,7462	3,1161±5,3839	2,2155±1,3213	3,5820±6,5282
Formato (μM±dp)	0,6133±3,6408	0,2610±0,6292	0,1613±0,2184	0,3125±0,7555



Figuras 34a e 34b. Exemplo de uma análise PCA com as componentes principais F1, F2 e F3: F1 (48% variância); F2 (19% variância); F3 (12% variância). A verde estão representados os indivíduos saudáveis, a azul os diabéticos controlados e a vermelho os diabéticos não controlados. Não ocorrendo uma clara distinção entre os grupos podem identificar-se certos padrões de distribuição de metabolitos (34a). Espectros ¹H-RMN típicos de salivas de indivíduos saudáveis (verde), diabéticos tipo I não controlados (azul) e diabéticos tipo I controlados (vermelho). Vários metabolitos estão identificados, sendo possível observar alterações nos níveis referentes a indivíduos saudáveis e diabéticos tipo I (34b).

Gráficos 3-10. Concentração na saliva (μM) dos diferentes metabolitos.



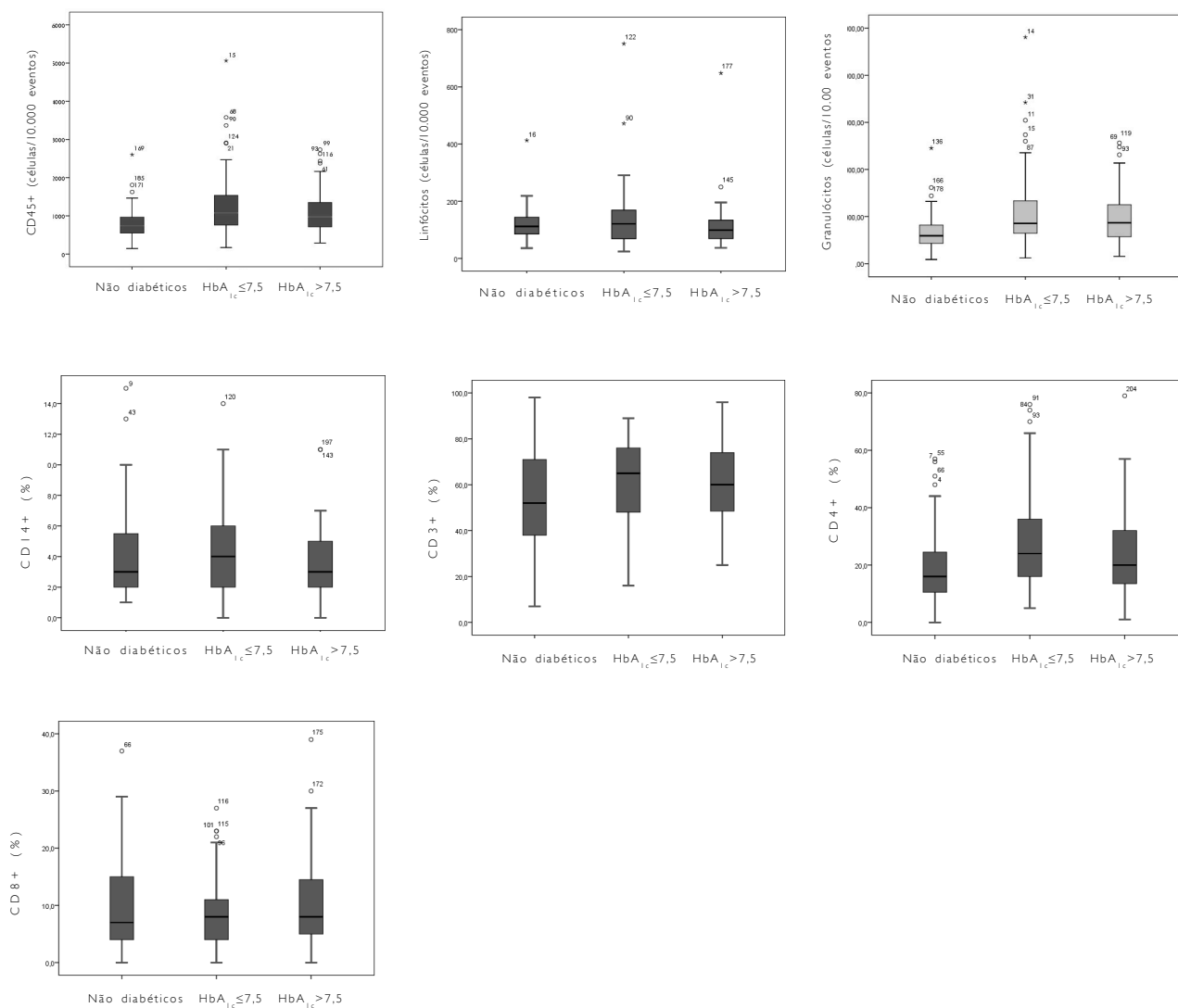
3.1.5 Caracterização da componente inflamatória salivar

Tabela XIII. Distribuição salivar das populações e subpopulações leucocitárias.

	Não diabéticos	Diabéticos	HbA _{1c} ≤7,5	HbA _{1c} >7,5
Leucócitos CD45+ (gate de CD45+ /10000 eventos)*	802,49±395,97	1198,55±733,29	1368,56±951,48	1110,61±577,03
Linfócitos (n° absoluto/10000 eventos)*	118,76±52,14	123,82±94,23	133,20±81,17	118,97±100,43
Granulócitos CD45+CD14-CD3- (n° absoluto/10000 eventos)*	654,70±389,63	1035,21±728,02	1082,14±863,70	994,88±590,69
CD14+	4,18±2,72	3,92±2,58	4,36±3,00	3,69±2,32
CD3+	55,04±22,44	61,32±17,79	64,56±15,88	59,64±18,58
CD3+CD4+	20,04±12,36	26,44±16,61	32,00±17,38	23,56±15,54
CD3+CD8+	10,11±8,04	9,77±7,24	9,44±6,55	9,94±7,59
CD4+/CD8+	3,30 ± 3,05	5,05±8,00	6,55 ± 11,13	4,27 ± 5,69

* De acordo com a metodologia adoptada no estudo (ver II, 2.5) os leucócitos, linfócitos e granulócitos são apresentados em número absoluto/aquisição de dados em citometria de fluxo.

Gráficos 11-17. Distribuição salivar das populações e subpopulações leucocitárias.



3.2 Análise inferencial

Esta vertente do tratamento de dados foi estruturada de acordo com as questões formuladas nos objetivos deste trabalho.

Tal como na apreciação descritiva, esta análise inferencial teve essencialmente em conta os subgrupos clínicos previamente definidos: subgrupo 1 - não diabéticos saudáveis; subgrupo 2 - diabéticos metabolicamente controlados ($HbA_{1c} \leq 7,5$); subgrupo 3 - diabéticos não controlados ($HbA_{1c} > 7,5$). No entanto, sempre que julgado oportuno e tendo por base um critério clínico, a análise foi efetuada considerando apenas os dois grupos principais, constituídos pelos diabéticos e não diabéticos.

Os testes aplicados fundamentaram-se nas características das variáveis, nomeadamente no nível de mensuração e distribuição das mesmas. Os pressupostos dos testes efetuados foram verificados previamente.

3.2.1 Questão I: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros de saúde oral?

Foi indagada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos e determinadas variáveis relativamente aos seguintes parâmetros:

- condição periodontal
- índice CPO
- índice cpo
- outras patologias orais

3.2.1.1 Condição periodontal

No que concerne à condição periodontal foi possível verificar associações ou diferenças estatisticamente significativas entre:

a) diabéticos e não diabéticos (Chi-quadrado, $p=0,001$); esta associação foi no sentido dos pacientes diabéticos apresentarem pior condição periodontal. A probabilidade dos diabéticos apresentarem hemorragia e/ou cálculos foi aproximadamente 3x superior à das crianças não diabéticas: OR=2,832, IC95% (1,524;5,263).

Tabela XIV. Relação entre a condição periodontal e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
Condição periodontal	São	Observações	34	31
		Observações esperadas	24	42
	Hemorragia e/ou cálculos	Observações	36	93
		Observações esperadas	46	82

b) não diabéticos e diabéticos controlados (Chi-quadrado, $p=0,023$); esta associação foi no sentido dos pacientes diabéticos controlados apresentarem pior condição periodontal. A probabilidade dos diabéticos controlados apresentarem hemorragia e/ou cálculos à sondagem foi aproximadamente 2x superior à das crianças não diabéticas: OR=2,361, IC95% (1,120;4,976).

Tabela XV. Relação entre a condição periodontal de não diabéticos e diabéticos controlados.

			Não diabéticos	HbA _{1c} ≤7,5
Condição periodontal	São	Observações	34	16
		Observações esperadas	28	22
	Hemorragia e/ou cálculos	Observações	36	40
		Observações esperadas	42	34

c) não diabéticos e diabéticos não controlados (Chi-quadrado, $p=0,001$); esta associação foi no sentido dos pacientes diabéticos não controlados apresentarem pior condição periodontal. A probabilidade dos diabéticos não controlados apresentarem hemorragia e/ou cálculos à sondagem foi aproximadamente 3x superior à dos não diabéticos: $OR=3,181$, $IC95\% (1,589;6,369)$.

Tabela XVI. Relação entre a condição periodontal de não diabéticos e diabéticos não controlados.

			Não diabéticos	HbA _{1c} >7,5
Condição periodontal	São	Observações	34	19
		Observações esperadas	24	29
	Hemorragia e/ou cálculos	Observações	36	64
		Observações esperadas	70	83

d) os escalões etários (Chi-quadrado, $p=0,002$); esta associação foi no sentido dos pacientes de menor idade (5-11 anos) apresentarem melhor condição periodontal. A probabilidade dos indivíduos de idade superior (12-15 anos) apresentarem hemorragia e/ou cálculos foi aproximadamente 3x superior à dos de menor idade (5-11 anos): $OR=2,630$, $IC95\% (1,413;4,894)$.

Tabela XVII. Relação entre a condição periodontal e os escalões etários.

			5-11 anos	12-15 anos
Condição periodontal	São	Observações	43	22
		Observações esperadas	33	32
	Hemorragia e/ou cálculos	Observações	55	74
		Observações esperadas	65	64

e) crianças com diferentes frequências de escovagem dentária (Chi-quadrado, $p=0,017$); esta associação foi no sentido dos pacientes com maior frequência de escovagem dentária ($>2x/dia$) apresentarem melhor condição periodontal.

Tabela XVIII. Relação entre a condição periodontal e a frequência de escovagem dentária.

			Não escova	$\leq 2x/dia$	$> 2x/dia$
Condição periodontal	São	Observações	1	29	35
		Observações esperadas	5	32	28
	Hemorragia e/ou cálculos	Observações	15	65	49
		Observações esperadas	11	62	56

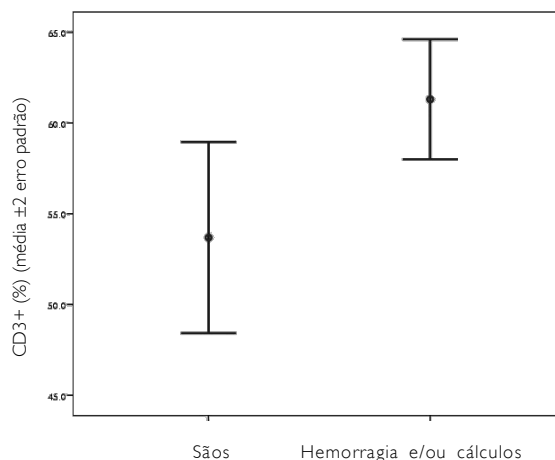
f) crianças com e sem má oclusão (Chi-quadrado, $p=0,004$); esta associação foi no sentido dos pacientes com má oclusão apresentarem pior condição periodontal. A probabilidade dos indivíduos com má oclusão apresentarem hemorragia e/ou cálculos foi aproximadamente 2x superior à probabilidade dos sem má oclusão: $OR=2,398$, $IC95\% (1,304;4,405)$.

Tabela XIX. Relação entre a condição periodontal e a presença de má oclusão.

			Com má oclusão	Sem má oclusão
Condição periodontal	São	Observações	29	36
		Observações esperadas	38	27
	Hemorragia e/ou cálculos	Observações	85	44
		Observações esperadas	76	53

g) crianças com diferentes valores percentuais de CD3+ na saliva (Mann-Whitney, $p=0,014$); esta associação foi no sentido das crianças com pior condição periodontal apresentarem valores médios CD3+ salivares mais elevados.

Gráfico 18. Gráfico de barras de erro (média \pm 2 erro padrão) representando a relação entre a condição periodontal e a subpopulação celular salivar de CD3+.



Paralelamente, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na associação da condição periodontal com:

- a) o controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,237$)(Mann-Whitney, $p=0,544$);
- b) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Chi-quadrado, $p=0,530$);
- c) o género (Chi-quadrado, $p=0,237$);
- d) a respiração bucal (Chi-quadrado, $p=0,084$);
- e) o fluxo salivar estimulado (Chi-quadrado, $p=0,154$);
- f) a contagem (n° absoluto) de linfócitos salivares (Mann-Whitney, $p=0,565$);
- g) as subpopulações celulares salivares de CD45+ (Mann-Whitney, $p=0,300$); CD14+ (Mann-Whitney, $p=0,858$); CD4+ (Mann-Whitney, $p=0,130$) e CD8+ (Mann-Whitney, $p=0,546$);

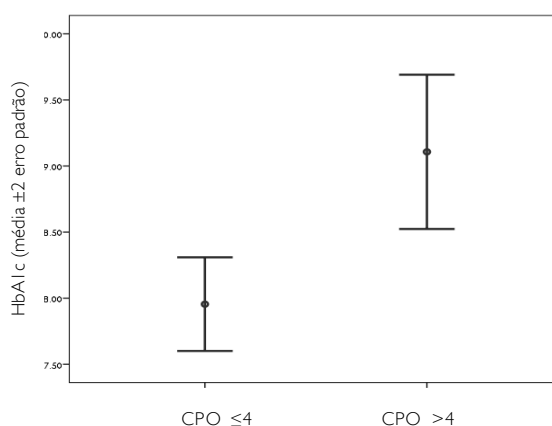
h) a concentração de diferentes metabolitos salivares: propionato (Mann-Whitney, $p=0,194$); lactato (Mann-Whitney, $p=0,668$); alanina (Mann-Whitney, $p=0,509$); etanol (Mann-Whitney, $p=0,344$); malato (Mann-Whitney, $p=0,746$); butirato (Mann-Whitney, $p=0,456$); acetato (Mann-Whitney, $p=0,132$); formato (Mann-Whitney, $p=0,318$).

3.2.1.2 Índice CPO

No que concerne ao índice CPO foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas na correlação com:

a) o controlo metabólico da DM (Mann-Whitney, $p=0,002$); observou-se que as crianças com valores mais elevados de HbA_{1c} apresentaram um índice CPO igualmente mais elevado.

Gráfico 19. Gráfico de barras de erro (média \pm 2 erro padrão) apresentando a relação entre o índice CPO e o controlo metabólico da DM.



b) os escalões etários (Chi-quadrado, $p<0,001$); esta associação foi no sentido das crianças mais novas (5-11 anos) apresentarem menor índice CPO. A probabilidade das crianças mais velhas (12-15 anos) apresentarem $CPO>4$ foi aproximadamente 11x superior à das crianças mais novas: $OR=11,227$, $IC95\%$ (3,210;39,264).

Tabela XX. Relação entre o índice CPO e a idade.

			5-11 anos	12-15 anos
Índice CPO	≤4	Observações	39	44
		Observações esperadas	28	55
	>4	Observações	3	38
		Observações esperadas	14	27

c) a frequência de escovagem dentária (Chi-quadrado, $p=0,005$); esta associação foi no sentido de os pacientes com maior frequência de escovagem dentária apresentarem um índice CPO mais elevado.

Tabela XXI. Relação entre o índice CPO e a frequência de escovagem dentária.

			Não escova	≤2x/dia	>2x/dia
Índice CPO	≤4	Observações	1	29	35
		Observações esperadas	5	32	28
	>4	Observações	15	65	49
		Observações esperadas	11	62	56

d) a má oclusão (Chi-quadrado, $p=0,014$); a associação foi no sentido dos pacientes com má oclusão apresentarem maior índice CPO. A probabilidade dos indivíduos com má oclusão apresentarem $CPO>4$ foi aproximadamente 3x superior à dos indivíduos sem má oclusão: $OR=2,857$, $IC95\%$ (1,214;6,757).

Tabela XXII. Relação entre o índice CPO e a má oclusão

			Com má oclusão	Sem má oclusão
Índice CPO	≤4	Observações	46	37
		Observações esperadas	52	31
	>4	Observações	32	9
		Observações esperadas	26	15

e) a carga bacteriana salivar (Chi-quadrado, $p<0,0001$); esta associação foi no sentido das crianças que evidenciaram concentrações salivares de *S. mutans* e *Lactobacillus* $\geq 10^5$ apresentarem um índice CPO mais elevado. A probabilidade das crianças com concentrações salivares de *S. mutans* e *Lactobacillus* $\geq 10^5$ apresentarem $CPO>4$ foi aproximadamente 37x superior às de concentrações salivares $< 10^5$: $OR=37,120$, $IC95\%$ (4,726;291,527).

Tabela XXIII. Relação entre o índice CPO e a carga bacteriana salivar.

			<i>S. mutans/Lactob</i> $< 10^5$	<i>S. mutans/Lactob</i> $\geq 10^5$
Índice CPO	≤4	Observações	32	25
		Observações esperadas	22	35
	>4	Observações	1	29
		Observações esperadas	11	19

Contrariamente, não se verificaram associações ou diferenças estatisticamente significativas considerando o índice CPO e:

- a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,625$);
- b) não diabéticos/diabéticos controlados (Chi-quadrado, $p=0,418$);
- c) não diabéticos/diabéticos não controlados (Chi-quadrado, $p=0,297$);
- d) o género (Chi-quadrado, $p=0,278$);
- e) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Chi-quadrado, $p=0,610$);
- f) a presença de respiração bucal (Chi-quadrado, $p=0,190$);
- g) a taxa de fluxo salivar estimulado (Chi-quadrado, $p=0,187$);
- h) a submissão prévia a suplementos de fluoretos (Chi-quadrado, $p=0,880$);
- i) a idade da 1ª consulta de Medicina Dentária (Chi-quadrado, $p=0,261$);
- j) o número de refeições diárias (Chi-quadrado, $p=0,108$);
- k) o tipo de bebidas habitualmente consumidas (teste exato de Fisher, $p=1$);
- l) frequência de consumo de guloseimas (Chi-quadrado, $p=0,470$).

3.2.1.3 Índice cpo

Foram encontradas associações estatisticamente significativas no índice cpo entre:

- a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p<0,001$); esta associação foi no sentido das crianças não diabéticas apresentarem maior índice cpo. A probabilidade das não diabéticas apresentarem $cpo>4$ foi aproximadamente 5x superior à das diabéticas: OR=4,658, IC95% (1,925;11,275).

Tabela XXIV. Relação entre o índice cpo e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
Índice cpo	≤4	Observações	24	43
		Observações esperadas	33	35
	>4	Observações	26	10
		Observações esperadas	17	18

- b) diabéticos controlados e não diabéticos (Chi-quadrado, $p=0,002$); esta associação foi no sentido dos não diabéticos apresentarem maior índice cpo. A probabilidade das crianças não diabéticas apresentarem $cpo>4$ foi aproximadamente 5x superior à probabilidade das diabéticas controladas: OR=5,208, IC95% (1,709;15,873).

Tabela XXV. Relação entre o índice cpo de não diabéticos e diabéticos controlados.

			Não diabéticos	DM controlada
Índice cpo	≤4	Observações	24	24
		Observações esperadas	30	18
	>4	Observações	26	5
		Observações esperadas	20	11

c) diabéticos não controlados e não diabéticos (Chi-quadrado, $p=0,001$); esta associação foi no sentido das crianças não diabéticas apresentarem maior índice cpo. A probabilidade dos não diabéticos apresentarem $cpo>4$ foi aproximadamente 6x superior à dos diabéticos não controlados: $OR=5,847$, $IC95\%$ (1,941;17,544).

Tabela XXVI. Relação entre o índice cpo de diabéticos não controlados e de não diabéticos.

			Não diabéticos	HbA _{1c} >7,5
Índice cpo	≤4	Observações	24	27
		Observações esperadas	31	20
	>4	Observações	26	5
		Observações esperadas	19	12

d) os escalões etários (teste exato de Fisher, $p=0,031$); esta associação foi no sentido das crianças mais novas apresentarem maior índice cpo. Apesar desta associação ser significativa, o intervalo de confiança a 95% (0,951;62,500) para o OR é muito largo, admitindo-se até a inexistência do mesmo ($OR=1$).

Tabela XXVII. Relação entre o índice cpo e os escalões etários.

			5-11 anos	12-15 anos
Índice cpo	≤4	Observações	24	27
		Observações esperadas	31	20
	>4	Observações	26	5
		Observações esperadas	19	12

e) o género (Chi-quadrado, $p=0,012$); esta associação foi no sentido dos pacientes do género masculino apresentarem maior índice cpo. A probabilidade das crianças do género masculino apresentarem $cpo>4$ foi aproximadamente 3x superior às do género feminino: $OR=3,086$, $IC95\%$ (1,264;7,576).

Tabela XXVIII. Relação entre o índice cpo e o género.

			♂	♀
Índice cpo	≤4	Observações	33	34
		Observações esperadas	39	28
	>4	Observações	27	9
		Observações esperadas	21	15

f) o número de refeições cumpridas diariamente (Chi-quadrado, $p=0,021$); esta associação foi no sentido das crianças com mais de 5 refeições diárias apresentarem menor índice cpo. A probabilidade das crianças com menos de 5 refeições diárias apresentarem cpo >4 foi aproximadamente 3x superior à das que cumprem um maior número de refeições: OR=2,639, IC95% (1,148;6,061).

Tabela XXIX. Relação entre o índice cpo e o número de refeições diárias.

			≤5 refeições/dia	>5 refeições/dia
Índice cpo	≤4	Observações	25	42
		Observações esperadas	31	36
	>4	Observações	22	14
		Observações esperadas	16	20

g) a carga bacteriana salivar (Chi-quadrado, $p<0,0001$); esta associação foi no sentido das crianças com concentrações salivares de *S. mutans* e *Lactobacillus* $\geq 10^5$ apresentarem maior índice cpo. A probabilidade dos indivíduos com concentração salivar destes microrganismos $\geq 10^5$ apresentarem cpo >4 foi aproximadamente 11x superior à dos que possuíam uma concentração salivar $< 10^5$: OR=10,800, IC95% (3,405;34,254).

Tabela XXX. Relação entre o índice cpo e a carga bacteriana salivar.

			<i>S. mutans</i> e <i>Lactob</i> $< 10^5$	<i>S. mutans</i> e <i>Lactob</i> $\geq 10^5$
Índice cpo	≤4	Observações	36	14
		Observações esperadas	27	23
	>4	Observações	5	21
		Observações esperadas	14	12

Neste mesmo contexto não se comprovaram correlações estatisticamente significativas entre o índice cpo e:

- a) o controlo metabólico da DM (t-Student, $p=0,448$);
- b) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (teste exato de Fisher, $p=0,484$);
- c) a frequência de escovagem dentária (Chi-quadrado, $p=0,055$);
- d) a respiração bucal (Chi-quadrado, $p=0,516$);
- e) a má oclusão (Chi-quadrado, $p=0,844$);
- f) o fluxo salivar estimulado (Chi-quadrado, $p=0,150$);
- g) a submissão a suplementos de fluoretos (Chi-quadrado, $p=0,897$);
- h) a idade da 1ª consulta de Medicina Dentária (Chi-quadrado, $p=0,471$);
- i) o tipo de bebidas habitualmente consumidas (Chi-quadrado teste exato de Fisher, $p=0,235$);
- j) a frequência de consumo de guloseimas (Chi-quadrado, $p=0,182$);
- k) a amamentação após o primeiro ano de idade (Chi-quadrado, $p=0,605$).

3.2.1.4 Presença de outras patologias orais

Neste tópico apenas foi possível verificar associações estatisticamente relevantes para as seguintes variáveis:

a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,034$); esta associação foi no sentido das crianças não diabéticas apresentarem com menor frequência outro tipo de patologias orais. A probabilidade dos diabéticos apresentarem outro tipo de patologias orais foi aproximadamente 3x superior: OR=3,173, IC95% (1,038;9,695).

Tabela XXXI. Relação entre a prevalência de outras patologias orais e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
Outras patologias orais	Sim	Observações	4	20
		Observações esperadas	9	15
	Não	Observações	66	104
		Observações esperadas	61	109

b) a idade da 1ª consulta de Medicina Dentária (Chi-quadrado, $p=0,002$); esta associação foi no sentido dos pacientes cuja 1ª consulta tenha ocorrido antes dos 6 anos apresentarem, com menor frequência, outro tipo de patologias. A probabilidade das crianças cuja 1ª consulta ocorreu depois dos 6 anos apresentarem outro tipo de patologias orais foi aproximadamente 6x superior: OR=5,780, IC95% (1,661;20,00).

Tabela XXXII. Relação entre a presença de outras patologias orais e a idade da 1ª consulta de Medicina Dentária.

			≤6 anos	>6 anos
Outras patologias orais	Sim	Observações	3	21
		Observações esperadas	10	14
	Não	Observações	76	92
		Observações esperadas	69	99

Não se constatou significância estatística desta variável na associação com:

- a) o controlo metabólico da DM (t-Student, $p=0,547$);
- b) ser não diabético/diabético controlado (Chi-quadrado, $p=0,058$);
- c) ser não diabético/diabético não controlado (Chi-quadrado, $p=0,051$);
- d) os anos decorridos desde o diagnóstico (Chi-quadrado, $p=0,727$);
- e) a idade (Chi-quadrado, $p=0,173$);
- f) o género (Chi-quadrado, $p=0,012$);
- g) a frequência de escovagem (Chi-quadrado, $p=0,149$);
- h) a respiração bucal (Chi-quadrado, $p=0,258$);
- i) a má oclusão (Chi-quadrado, $p=0,691$);
- j) o fluxo salivar estimulado (Chi-quadrado, $p=0,093$);
- k) a submissão prévia a suplementos de fluoretos (Chi-quadrado, $p=0,135$);
- l) má experiência prévia na consulta (Chi-quadrado, $p=0,179$);
- m) o número de refeições cumpridas diariamente (Chi-quadrado, $p=0,053$);
- n) o tipo de bebidas habitualmente consumidas (teste exato de Fisher, $p=1,0$);
- o) a frequência de consumo de guloseimas (Chi-quadrado, $p=0,613$);
- p) a amamentação após 1 ano de idade (Chi-quadrado, $p=0,304$);
- q) a carga bacteriana salivar (Chi-quadrado, $p=0,745$);
- r) a contagem absoluta de linfócitos salivares (Mann-Whitney, $p=0,713$);
- s) a concentração salivar de CD45+ (Mann-Whitney, $p=0,312$); CD14+ (Mann-Whitney, $p=0,614$); CD3+ (Mann-Whitney, $p=0,086$); CD4+ (Mann-Whitney, $p=0,682$); CD8+ (Mann-Whitney, $p=0,735$).

Desta forma pode concluir-se que há rejeição da hipótese nula H_0 : “Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações dos parâmetros de saúde oral”.

3.2.2 Questão 2: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros microbiológicos orais?

Para responder a esta questão foram avaliadas as relações estatísticas entre a carga bacteriana salivar (*S. mutans* e *Lactobacillus*), a presença, carga e tipo de leveduras na saliva e na mucosa com os subgrupos clínicos e algumas variáveis relevantes.

3.2.2.1 Carga bacteriana salivar

Encontraram-se associações estatisticamente significativas na carga bacteriana salivar relativamente aos seguintes parâmetros:

a) ser diabético controlado/ser não diabético (Chi-quadrado, $p=0,019$); esta associação foi no sentido dos diabéticos controlados apresentarem menor carga bacteriana de *S. mutans* e *Lactobacillus* do que os saudáveis. A probabilidade das crianças saudáveis apresentarem maior carga bacteriana foi aproximadamente 3x superior à das diabéticas controladas: OR=2,625, IC95% (1,159;5,952).

Tabela XXXIII. Relação entre a carga bacteriana salivar e ser não diabético/diabético controlado.

			Não diabético	HbA _{1c} ≤7,5
<i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i>	<10 ⁵ UFC/mL	Observações	24	35
		Observações esperadas	30	29
	≥10 ⁵ UFC/mL	Observações	27	15
		Observações esperadas	21	21

b) o género (Chi-quadrado, $p=0,029$); esta associação foi no sentido das crianças do género masculino apresentarem maior carga bacteriana salivar de *S. mutans* e *Lactobacillus*. A probabilidade das crianças do género masculino apresentarem maior carga bacteriana salivar foi aproximadamente 2x superior: OR=2,053, IC95% (1,072;3,922).

Tabela XXXIV. Relação entre a carga bacteriana salivar e o género.

			♂	♀
<i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i>	<10 ⁵ UFC/mL	Observações	42	45
		Observações esperadas	49	38
	≥10 ⁵ UFC/mL	Observações	46	24
		Observações esperadas	39	31

c) a frequência de escovagem dentária (Chi-quadrado, $p=0,012$); esta associação foi no sentido das crianças que relatam maior frequência de escovagem dentária ($> 2x/dia$) apresentarem menor carga bacteriana salivar de *S. mutans* e *Lactobacillus*.

Tabela XXXV. Relação entre carga bacteriana salivar e frequência de escovagem dentária.

			Não escova	$\leq 2x/dia$	$> 2x/dia$
<i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i>	$< 10^5$ UFC/mL	Observações	4	74	9
		Observações esperadas	8	74	6
	$\geq 10^5$ UFC/mL	Observações	10	59	1
		Observações esperadas	6	59	4

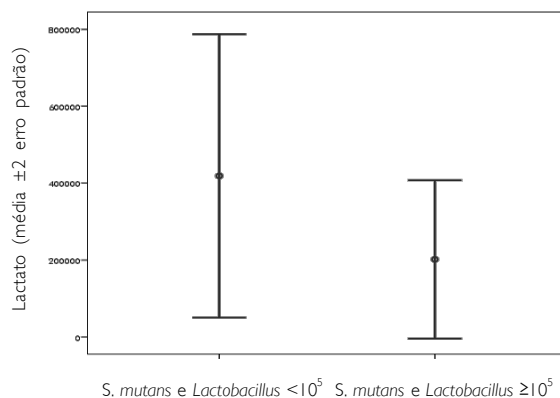
d) a capacidade tampão da saliva (Chi-quadrado, $p<0,0001$); esta associação foi no sentido das crianças cuja saliva evidenciou maior capacidade tampão apresentarem menor carga bacteriana de *S. mutans* e *Lactobacillus*.

Tabela XXXVI. Relação entre a carga bacteriana e a capacidade tampão da saliva.

			Baixa	Média	Alta
<i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i>	$< 10^5$ UFC/mL	Observações	1	6	80
		Observações esperadas	7	17	63
	$\geq 10^5$ UFC/mL	Observações	11	25	34
		Observações esperadas	5	14	51

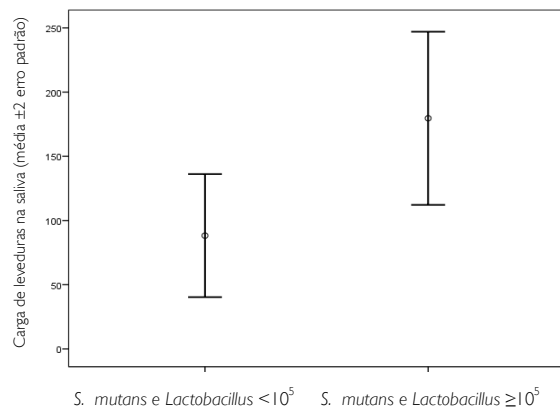
e) a concentração salivar de lactato (Mann-Whitney, $p=0,019$); observou-se que as crianças com maior carga bacteriana salivar de *S. mutans* e *Lactobacillus* apresentaram menores concentrações salivares de lactato.

Gráfico 20. Relação entre a carga bacteriana e a concentração salivar de lactato.



f) a carga de leveduras na saliva (Mann-Whitney, $p=0,036$); observou-se que as crianças com menor carga bacteriana de *S. mutans* e *Lactobacillus* salivares apresentaram igualmente menor carga de leveduras na saliva.

Gráfico 21. Relação entre a carga bacteriana e a carga de leveduras.



g) a frequência de consumo de guloseimas (Chi-quadrado, $p=0,026$); observou-se que crianças com maior frequência de consumo de guloseimas apresentaram maior carga bacteriana. A probabilidade das crianças com maior frequência de consumo de guloseimas apresentarem maior carga bacteriana foi aproximadamente 2x superior OR=2,093, IC95% (1,085;4,034).

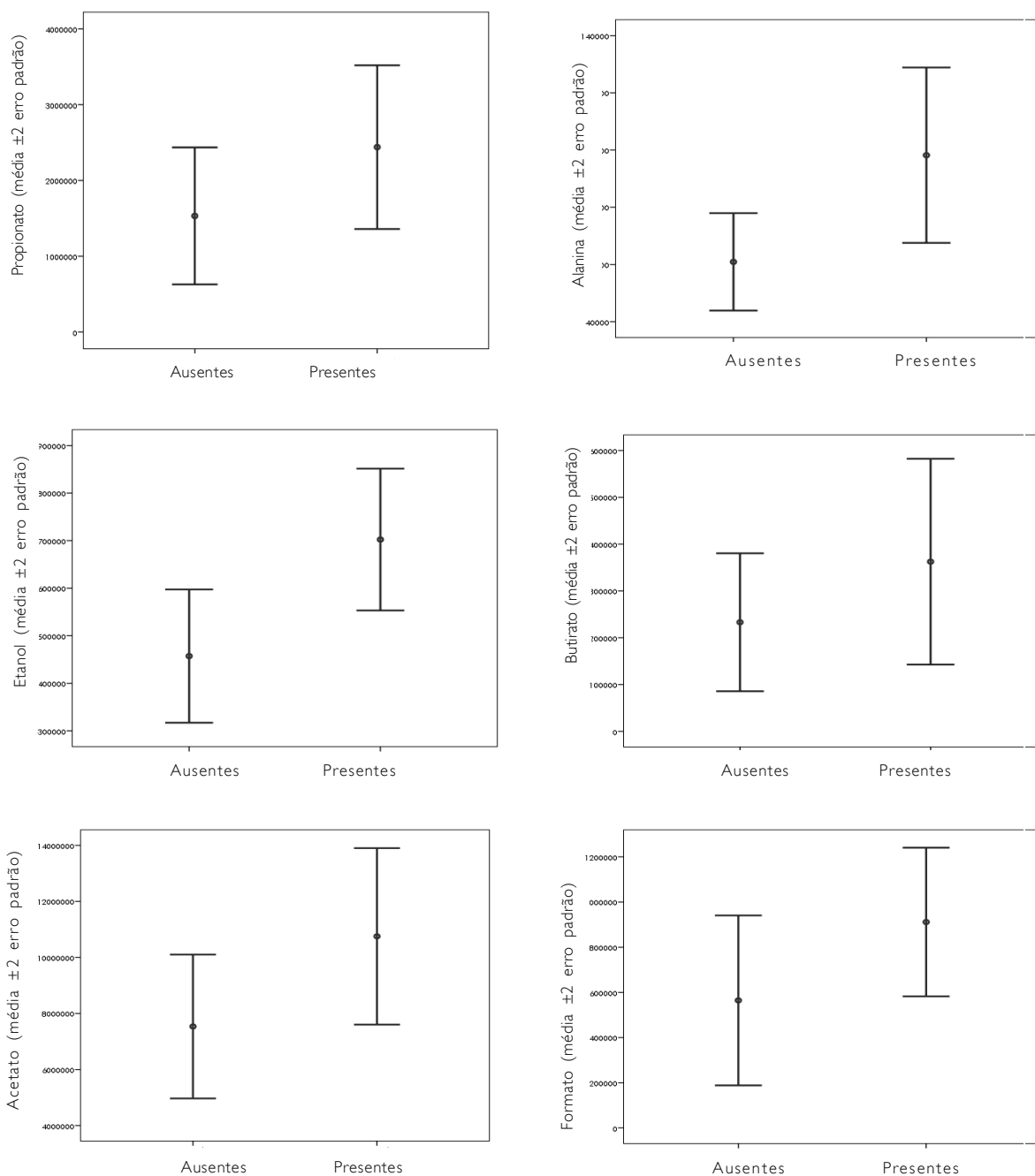
Por outro lado não se verificaram associações estatisticamente significativas entre a carga bacteriana salivar de *S. mutans* e *Lactobacillus* e:

- a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,144$) e (Mann-Whitney, $p=0,680$);
- b) o controlo metabólico da DM (Mann-Whitney, $p=0,074$);
- c) ser não diabético/diabético não controlado (Chi-quadrado, $p=0,473$);
- d) a idade (Chi-quadrado, $p=0,385$);
- e) o número de refeições diárias (Chi-quadrado, $p=0,749$);
- f) o fluxo salivar estimulado (Chi-quadrado, $p=0,091$);
- g) carga de leveduras na mucosa (Mann-Whitney, $p=0,201$);
- h) a concentração salivar de: alanina (Mann-Whitney, $p=0,845$); etanol (Mann-Whitney, $p=0,566$); malato (Mann-Whitney, $p=0,720$); butirato (Mann-Whitney, $p=0,216$); acetato (Mann-Whitney, $p=0,996$); formato (Mann-Whitney, $p=0,863$); propionato (Mann-Whitney, $p=0,836$);
- i) a contagem (nº absoluto) de linfócitos salivares/10.000 eventos (Mann-Whitney, $p=0,485$);
- j) os seguintes marcadores inflamatórios salivares: CD45+ (Mann-Whitney, $p=0,626$); CD14+ (Mann-Whitney, $p=0,059$); CD3+ (Mann-Whitney, $p=0,788$); CD4+ (Mann-Whitney, $p=0,541$); CD8+ (Mann-Whitney, $p=0,084$).

3.2.2.2 Presença de leveduras na saliva

Encontraram-se associações estatisticamente significativas entre a presença de leveduras na saliva e a concentração salivar de propionato (Mann-Whitney, $p < 0,001$), alanina (Mann-Whitney, $p = 0,006$), etanol (Mann-Whitney, $p < 0,001$), butirato (Mann-Whitney, $p = 0,017$) e acetato (Mann-Whitney, $p = 0,001$) e formato (Mann-Whitney, $p = 0,002$); observou-se que as crianças com presença de leveduras na saliva apresentaram maiores concentrações destes metabolitos.

Gráficos 22-27. Relação entre a presença de leveduras na saliva e a concentração salivar de propionato, alanina, etanol, butirato, acetato e formato.



Não puderam ser constatadas associações com relevo estatístico referentes à presença de leveduras na saliva no que concerne:

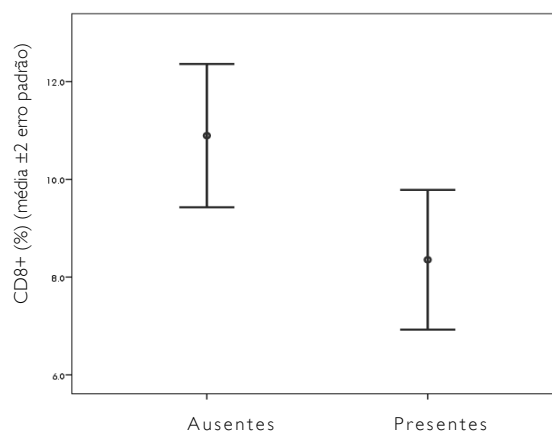
- a) à presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,534$);
- b) ao controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,862$)(Mann-Whitney, $p=0,990$);
- c) a ser diabético controlado/não diabético (Chi-quadrado, $p=0,537$);
- d) a ser diabético não controlado/não diabético(Chi-quadrado, $p=0,684$);
- e) aos anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Chi-quadrado, $p=0,593$);
- f) à idade (Chi-quadrado, $p=0,205$);
- g) ao género (Chi-quadrado, $p=0,499$);
- h) à residência (Chi-quadrado, $p=0,490$);
- i) à frequência de escovagem dentária (Chi-quadrado, $p=0,359$);
- j) ao número de refeições cumpridas diariamente (Chi-quadrado, $p=0,865$);
- k) à frequência de consumo de guloseimas (Chi-quadrado, $p=0,505$);
- l) aos índices CPO (Chi-quadrado, $p=0,618$) e cpo (Chi-quadrado, $p=0,756$);
- m) ao fluxo salivar estimulado (Chi-quadrado, $p=0,992$) e capacidade tampão salivar (Chi-quadrado, $p=0,526$);
- n) à contagem de linfócitos salivares/10.000 eventos (Mann-Whitney, $p=0,918$);
- o) à percentagem das subpopulações inflamatórias salivares: CD45+ (Mann-Whitney, $p=0,758$); CD14+ (Mann-Whitney, $p=0,578$); CD3+ (Mann-Whitney, $p=0,253$); CD4+ (Mann-Whitney, $p=0,550$) e CD8+ (Mann-Whitney, $p=0,137$);
- p) à concentração salivar de lactato (Mann-Whitney, $p=0,452$) e malato (Mann-Whitney, $p=0,943$).

3.2.2.3 Presença de leveduras na mucosa

Foram encontradas associações estatisticamente significativas relativas à presença de leveduras na mucosa no que respeita:

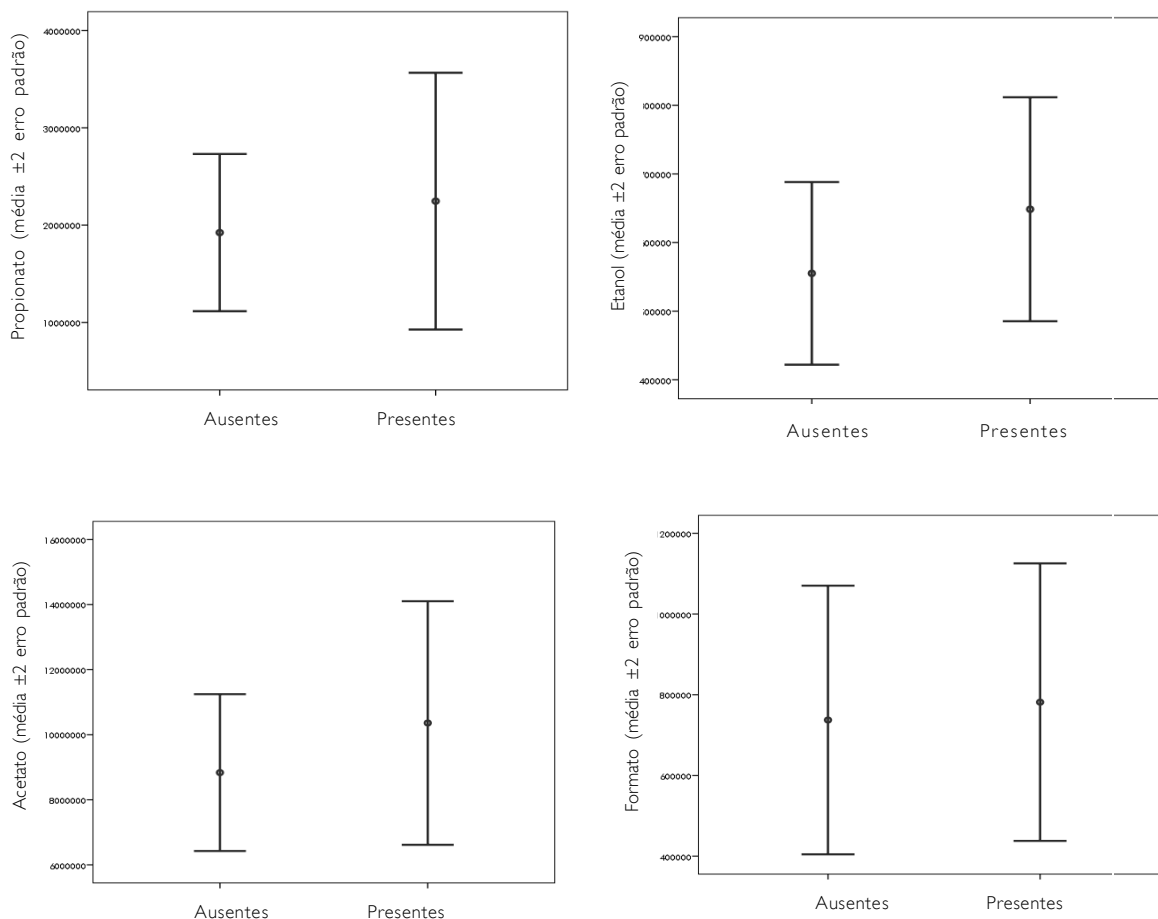
- a) à subpopulação salivar de CD8+ (Mann-Whitney, $p=0,026$); observou-se que as crianças com leveduras na mucosa apresentaram uma menor percentagem de CD8+ na saliva.

Gráfico 28. Relação entre a presença de leveduras na mucosa e a subpopulação salivar de CD8+.



b) à concentração salivar de propionato (Mann-Whitney, $p=0,012$), etanol (Mann-Whitney, $p=0,002$), acetato (Mann-Whitney, $p=0,006$) e formato (Mann-Whitney, $p=0,044$); observou-se que as crianças com presença de leveduras na mucosa apresentaram maiores concentrações destes metabolitos.

Gráficos 29-32. Relação entre a presença de leveduras na mucosa e a concentração salivar de propionato, etanol, acetato e formato.



Não foram encontradas associações/diferenças estatisticamente significativas entre a presença de leveduras na mucosa com relação:

- à presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,276$);
- ao controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,470$)(Mann-Whitney, $p=0,187$);
- a ser diabético controlado/não diabético (Chi-quadrado, $p=0,193$);
- a ser diabético não controlado/não diabético (Chi-quadrado, $p=0,592$);
- aos anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Chi-quadrado, $p=0,324$);
- à idade (Chi-quadrado, $p=0,653$);
- ao género (Chi-quadrado, $p=0,068$);
- à residência (Chi-quadrado, $p=0,258$);
- à frequência de escovagem dentária (Chi-quadrado, $p=0,123$);
- ao número de refeições diárias (Chi-quadrado, $p=0,702$);
- à frequência de consumo de guloseimas (Chi-quadrado, $p=0,836$);

- l) ao índice CPO (Chi-quadrado, $p=0,071$) e cpo (Chi-quadrado, $p=0,405$);
- m) ao fluxo salivar estimulado (Chi-quadrado, $p=0,688$) e capacidade tampão da saliva (Mann-Whitney, $p=0,932$);
- n) ao nº absoluto (contagem) de linfócitos salivares (Mann-Whitney, $p=0,877$);
- o) aos marcadores inflamatórios salivares CD45+ (Mann-Whitney, $p=0,642$); CD14+ (Mann-Whitney, $p=0,801$); CD3+ (Mann-Whitney, $p=0,302$) e CD4+ (Mann-Whitney, $p=0,070$);
- p) à concentração salivar de lactato (Mann-Whitney, $p=0,934$), alanina (Mann-Whitney, $p=0,176$), malato (Mann-Whitney, $p=0,985$) e butirato (Mann-Whitney, $p=0,057$).

3.2.2.4 Carga de leveduras na saliva

Tendo por base os resultados obtidos para a presença de leveduras na saliva analisou-se com maior profundidade o que aconteceu nos casos em que foram detetadas diferenças ou associações significativas. Nos restantes casos não serão expectáveis diferenças uma vez que a variável “presença de leveduras” traduz uma discretização da variável “carga de leveduras”.

Assim, constataram-se correlações significativas, todavia fracas, entre a carga de leveduras na saliva e as concentrações salivares de: propionato (Coeficiente de Spearman= $0,214$, $p=0,003$), alanina (Coeficiente de Spearman= $0,19$, $p=0,007$), etanol (Coeficiente de Spearman= $0,222$, $p=0,002$); acetato (Coeficiente de Spearman= $0,232$, $p=0,001$) e formato (Coeficiente de Spearman= $0,203$, $p=0,004$).

3.2.2.5 Carga de leveduras na mucosa

De modo análogo, tendo por base os resultados obtidos para a presença de leveduras na mucosa, analisaram-se especificamente as situações em que foram detetadas diferenças ou associações significativas sendo que, da mesma forma, e pelas razões atrás expostas, nos restantes casos não serão expectáveis quaisquer diferenças. Assim, constataram-se correlações significativas, embora igualmente fracas, entre a carga de leveduras na mucosa e:

- a) a subpopulação salivar de CD8+ (Coeficiente de Spearman= $-0,149$, $p=0,035$);
- b) concentrações salivares de propionato (Coeficiente de Spearman= $0,184$, $p=0,009$); etanol (Coeficiente de Spearman= $0,174$, $p=0,014$); acetato (Coeficiente de Spearman= $0,200$, $p=0,004$) e formato (Coeficiente de Spearman= $0,164$, $p=0,020$).

3.2.2.6 Tipo de espécies de leveduras na saliva

Na análise complementar da biodiversidade de leveduras da saliva foi efetuada uma estatística descritiva e calculado o índice de Simpson para os diferentes grupos ou subgrupos da amostra.

a) Tipo de leveduras na saliva de diabéticos e não diabéticos

Tabela XXXVII. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com a presença de DM.

	Não diabéticos	Diabéticos
Sem leveduras	29 (40,3)	55 (41,4)
<i>C. albicans</i>	32 (44,4)	62 (46,6)
<i>C. railenensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (1,4)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondi</i>	3 (4,2)	0 (0,0)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	1 (0,8)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	1 (1,4)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	2 (2,8)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 (1,4)	2 (1,5)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1 (1,4)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	1 (0,8)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	1 (0,8)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1 (1,4)	0 (0,0)
Sem registo	0 (0,0)	4 (3,0)
Sem saliva	1 (1,4)	7 (5,3)

Tabela XXXVIII. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com a presença de DM.

	Diabéticos	Não diabéticos
Índice de Simpson (IC 95%)	0,1694 (0,1548; 0,1840)	0,4441 (0,4163; 0,4719)

Pode concluir-se que a biodiversidade salivar foi significativamente superior nos não diabéticos.

b) Tipo de leveduras na saliva de acordo com a condição clínica

Tabela XXXIX. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com os subgrupos clínicos.

	Não diabéticos	HbA _{1c} ≤ 7,5	HbA _{1c} > 7,5
Sem leveduras	29 (40,3)	19 (42,2)	36 (40,9)
<i>C. albicans</i>	32 (44,4)	20 (44,4)	42 (48,6)
<i>C. railenensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondi</i>	3 (4,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	2 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 (1,4)	2 (3,3)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	0 (0,0)	2 (3,3)	2 (2,8)
Sem saliva	1 (1,4)	2 (4,4)	5 (5,7)

Tabela XL. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com os subgrupos clínicos.

	Não diabéticos	HbA _{1c} ≤ 7,5	HbA _{1c} >7,5
Índice (IC 95%)	0,4441 (0,4163; 0,4719)	0,1700 (0,1281; 0,2118)	0,1681 (0,1467; 0,1895)

Pode concluir-se que a biodiversidade salivar foi significativamente superior nos não diabéticos e não significativamente diferente entre os subgrupos de diabéticos.

c) Tipo de leveduras na saliva de acordo com a duração da DM

Tabela XLI. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com os anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

	<5 anos	≥5 anos
Sem leveduras	27 (43,5)	28 (39,4)
<i>C. albicans</i>	26 (41,9)	36 (50,7)
<i>C. railenensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondi</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. krusei</i>	1 (1,6)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2 (3,2)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	1 (1,4)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	1 (1,6)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	1 (1,6)	3 (4,2)
Sem saliva	4 (6,5)	3 (4,2)

Tabela XLII. Análise da biodiversidade salivar de leveduras relativamente aos anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

	<5 anos	≥5 anos
Índice de Simpson (IC 95%)	0,2989 (0,2619, 0,3360)	0,0541 (0,0378; 0,0703)

Pode concluir-se que a biodiversidade salivar foi significativamente inferior nos diabéticos cujo diagnóstico havia ocorrido há mais de 5 anos.

d) Tipo de leveduras na saliva de acordo com a idade

Tabela XLIII. Distribuição do tipo de leveduras na saliva por escalões etários.

	5-11 anos	12-15 anos
Sem leveduras	49 (45,0)	35 (36,5)
<i>C. albicans</i>	45 (41,3)	49 (51,0)
<i>C. railenensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0,0)	1 (1,0)
<i>C. guilliermondi</i>	3 (2,8)	0 (0,0)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	1 (1,0)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	1 (1,0)
<i>C. zeylanoides</i>	3 (2,8)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	2 (1,8)	1 (1,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	1 (1,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	1 (1,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	1 (1,0)
Sem registo	2 (1,8)	2 (2,1)
Sem saliva	5 (4,6)	3 (3,1)

Tabela XLIV. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com os escalões etários.

	5-11 anos	12-15 anos
Índice de Simpson (IC 95%)	0,2779 (0,2565; 0,2993)	0,2632 (0,2430; 0,2833)

Pode concluir-se que a idade não foi um fator que diferenciou significativamente a biodiversidade salivar de leveduras.

e) Tipo de leveduras na saliva de acordo com o género

Tabela XLV. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com o género.

	♂	♀
Sem leveduras	52 (44,4)	32 (36,4)
<i>C. albicans</i>	54 (46,2)	40 (45,5)
<i>C. railenensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>C. guilliermondi</i>	1 (0,9)	2 (2,3)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	2 (1,7)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	0 (0,0)	3 (3,4)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
Sem registo	2 (1,7)	2 (2,3)
Sem saliva	2 (1,7)	6 (6,8)

Tabela XLVI. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com o gênero.

	♂	♀
Índice de Simpson (IC 95%)	0,2175 (0,1998; 0,2352)	0,3050 (0,2808; 0,3291)

Pode concluir-se que a biodiversidade na saliva foi significativamente inferior no gênero masculino.

f) Tipo de leveduras na saliva de acordo com a área de residência

Tabela XLVII. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com a área de residência.

	Rural	Urbana
Sem leveduras	60 (41,1)	24 (40,7)
<i>C. albicans</i>	70 (47,9)	24 (40,7)
<i>C. raileyensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (0,7)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondi</i>	1 (0,7)	2 (3,4)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	1 (1,7)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsilosis</i>	1 (0,7)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	1 (0,7)	1 (1,7)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 (2,1)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1 (0,7)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	1 (0,7)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	1 (1,7)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1 (0,7)	0 (0,0)
Sem registo	2 (1,4)	2 (3,4)
Sem saliva	4 (2,7)	4 (6,8)

Tabela XLVIII. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com a área de residência.

	Rural	Urbana
Índice de Simpson (IC 95%)	0,2348 (0,2209; 0,2487)	0,3632 (0,3235; 0,4029)

Pode concluir-se que a biodiversidade na saliva foi significativamente superior no grupo de crianças com residência urbana.

g) Tipo de leveduras na saliva de acordo com a frequência de escovagem dentária

Tabela XLIX. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com a frequência de escovagem dentária.

	Não escova	≤2x/dia	>2x/dia
Sem leveduras	4 (25,0)	77 (43,3)	3 (27,3)
<i>C. albicans</i>	10 (62,5)	78 (43,8)	6 (54,5)
<i>C. railenensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondi</i>	0 (0,0)	3 (1,7)	0 (0,0)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	2 (1,1)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 (0,0)	3 (1,7)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
Sem registo	0 (0,0)	4 (2,2)	0 (0,0)
Sem saliva	1 (6,3)	5 (2,8)	2 (18,2)

Tabela L. Análise da biodiversidade salivar de leveduras em relação à frequência de escovagem dentária.

	Não escova	≤2x/dia	>2/dia
Índice (IC 95%)	0,4441 (0,4163; 0,4719)	0,1700 (0,1281; 0,2118)	0,1681 (0,1467; 0,1895)

Pode concluir-se que a biodiversidade na saliva foi significativamente mais elevada no grupo que não escovava os dentes não se verificando, contudo, diferenças estatisticamente significativas na biodiversidade entre os grupos com diferentes frequências de escovagem dentária.

3.2.2.6.1 Tipo de espécies de leveduras na saliva - *C. albicans* vs outras espécies

Atendendo a que a *C. albicans* foi a espécie mais prevalente correlacionou-se a presença desta levedura, face a todas as restantes, com diferentes fatores. Desta forma, puderam ser determinadas associações estatisticamente significativas na relação da *C. albicans* vs outras espécies e:

a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,016$); esta associação foi no sentido das crianças diabéticas apresentarem com maior frequência *C. albicans* na saliva, numa probabilidade de ocorrência cerca de 4x superior: OR=3,875, IC95% (1,221; 12,302).

Tabela LI. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
Tipo de leveduras na saliva	<i>C. albicans</i>	Observações	32	62
		Observações esperadas	36	58
	Outras espécies	Observações	11	6
		Observações esperadas	7	10

b) ser diabético não controlado ou não diabético (Chi-quadrado, $p=0,025$); esta associação foi no sentido dos diabéticos não controlados apresentarem com maior frequência *C. albicans* na saliva, numa probabilidade cerca de 4x superior: OR=4,3668, IC95% (1,112;17,241).

Tabela LII. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e ser diabético não controlado ou não diabético.

			Não diabéticos	HbA _{1c} ≥7,5
Tipo de leveduras na saliva	<i>C. albicans</i>	Observações	32	42
		Observações esperadas	36	38
	Outras espécies	Observações	11	4
		Observações esperadas	7	8

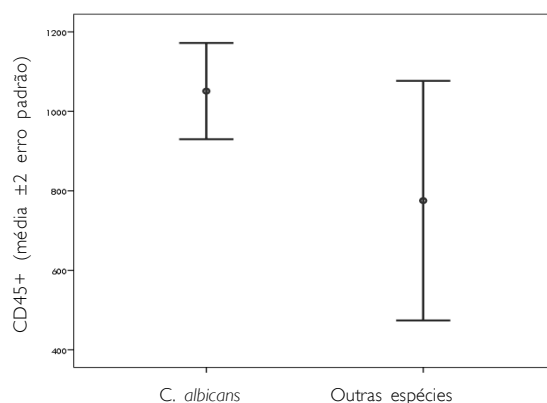
c) a respetiva carga (Chi-quadrado, $p=0,039$); esta associação foi no sentido das crianças com menor carga de leveduras apresentarem igualmente com menor frequência *C. albicans*. A probabilidade das crianças com maior frequência de *C. albicans* apresentarem simultaneamente uma carga de leveduras >100 UFC/mL foi aproximadamente 3x superior: OR=3,401 (1,011;11,494).

Tabela LIII. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a respetiva carga.

			≤100 UFC/mL	>100 UFC/mL
Tipo de leveduras na saliva	<i>C. albicans</i>	Observações	42	52
		Observações esperadas	46	48
	Outras espécies	Observações	11	4
		Observações esperadas	7	8

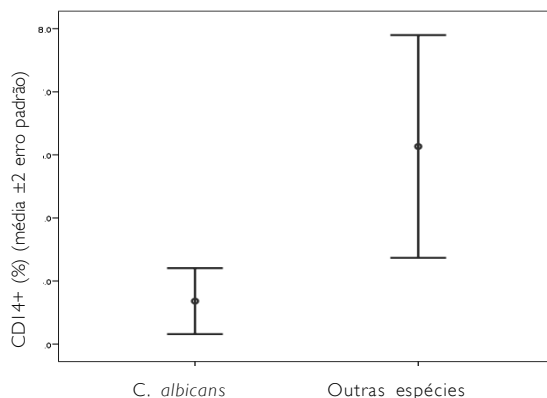
d) a subpopulação salivar de CD45+ (Mann-Whitney, $p=0,018$); observou-se que as crianças com maior prevalência de *C. albicans* no esfregaço apresentaram maior número de CD45+.

Gráfico 33. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a subpopulação salivar de CD45+.



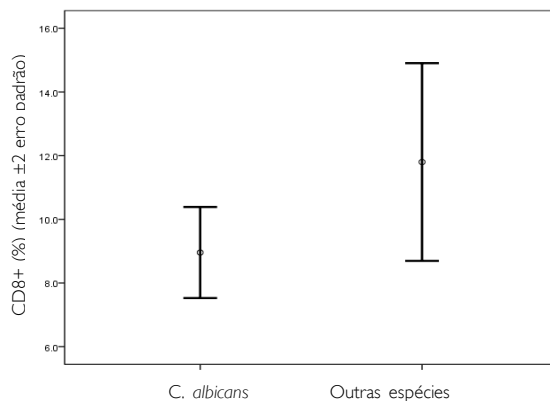
e) a subpopulação salivar de CD14+ (Mann-Whitney, $p=0,001$); observou-se que as crianças com maior prevalência de “outras espécies” apresentaram maior percentagem de CD14+.

Gráfico 34. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a subpopulação salivar de CD14+.



f) a subpopulação salivar de CD8+ (Mann-Whitney, $p=0,037$); observou-se que as crianças com maior prevalência de “outras espécies” apresentaram maior percentagem de CD8+.

Gráfico 35. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a subpopulação salivar de CD8+.



Inversamente, não se detetaram associações estatisticamente significativas entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) na relação com:

- a) o controlo metabólico da DM (Mann-Whitney, $p=0,382$)(teste exato de Fisher, $p=0,174$);
- b) ser diabético controlado/ser não diabético (Chi-quadrado, $p=0,242$);
- c) a idade (Chi-quadrado, $p=0,694$);
- d) o género (Chi-quadrado, $p=0,435$);
- e) a frequência de escovagem dentária (Mann-Whitney, $p = 0,845$);
- f) o número de refeições diárias (Chi-quadrado, $p=0,155$);

- g) o fluxo salivar estimulado (Teste exato de Fisher, $p=0,268$);
- h) a contagem de linfócitos salivares/10.000 eventos (Mann-Whitney, $p=0,057$);
- i) a subpopulação salivar de CD3+ (Mann-Whitney, $p=0,197$); CD4+ (Mann-Whitney, $p=0,269$);
- j) a concentração de diferentes metabolitos salivares: propionato (Mann-Whitney, $p=0,586$); lactato (Mann-Whitney, $p=0,567$); alanina (Mann-Whitney, $p=0,604$); etanol (Mann-Whitney, $p=0,944$); malato (Mann-Whitney, $p=0,338$); butirato (Mann-Whitney, $p=0,819$); acetato (Mann-Whitney, $p=0,826$); formato (Mann-Whitney, $p=0,902$).

3.2.2.7 Tipo de espécies de leveduras na mucosa

- a) Tipo de leveduras na mucosa de diabéticos e não diabéticos

Tabela LIV. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com a presença de DM.

	Não diabéticos	Diabéticos
Sem leveduras	40 (55,6)	84 (63,2)
<i>C. albicans</i>	24 (33,3)	41 (30,8)
<i>C. railenensis</i>	2 (2,8)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0,0)	1 (0,8)
<i>C. guilliermondi</i>	2 (2,8)	1 (0,8)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	1 (1,4)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	1 (1,4)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	2 (2,8)	6 (4,5)

Tabela LV. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa de acordo com a presença de DM.

	Diabéticos	Não diabéticos
Índice de Simpson (IC 95%)	0,3177 (0,2778; 0,3577)	0,0899 (0,0725; 0,1072)

Pode concluir-se que a biodiversidade de leveduras na mucosa nos não diabéticos foi significativamente superior.

b) Tipo de leveduras na mucosa de acordo com a condição clínica

Tabela LVI. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com os subgrupos clínicos.

	Não diabéticos	HbA _{1c} ≤7,5	HbA _{1c} >7,5
Sem leveduras	40 (55,6)	33 (73,3)	51 (58,0)
<i>C. albicans</i>	24 (33,3)	10 (22,2)	31 (35,2)
<i>C. raillenensis</i>	2 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>C. guilliermondi</i>	2 (2,8)	0 (0,0)	1 (1,1)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	2 (2,8)	2 (4,4)	4 (4,5)

Tabela LVII. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa de acordo com os subgrupos clínicos.

	Não diabéticos	HbA _{1c} ≤ 7,5	HbA _{1c} > 7,5
Índice (IC 95%)	0,3177 (0,2778; 0,3577)	0,0 (0,0; 0,0)	0,1230 (0,0961; 0,1499)

Pode concluir-se que houve diferenças entre os não diabéticos e os diabéticos com HbA_{1c}>7,5; o valor 0,0 indica que apenas se registou uma espécie nesse mesmo grupo.

c) Tipo de leveduras na mucosa de acordo com a duração da DM

Tabela LVIII. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com os anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

	<5 anos	≥5 anos
Sem leveduras	42 (67,7)	42 (59,2)
<i>C. albicans</i>	18 (29,0)	23 (32,4)
<i>C. raillenensis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0,0)	1 (1,4)
<i>C. guilliermondi</i>	0 (0,0)	1 (1,4)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	2 (3,2)	4 (5,6)

Tabela LIX. Análise da biodiversidade da mucosa em relação aos anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

	<5 anos	≥5 anos
Índice de Simpson (IC 95%)	0,00 (0,00; 0,00)	0,1508 (0,1151; 0,1864)

Para o grupo com um diagnóstico mais recente da DM constatou-se existir apenas uma espécie na mucosa, não se verificando o mesmo para crianças cujo diagnóstico tivesse ocorrido há mais de 5 anos.

d) Tipo de leveduras na mucosa de acordo com a idade

Tabela LX. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa por escalões etários.

	5-11 anos	12-15 anos
Sem leveduras	68 (62,4)	56 (58,3)
<i>C. albicans</i>	32 (29,4)	33 (34,4)
<i>C. raileyensis</i>	1 (0,9)	1 (1,0)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondii</i>	2 (1,8)	1 (1,0)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	1 (1,0)
<i>C. parapsilosis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	4 (3,7)	4 (4,2)

Tabela LXI. Análise da biodiversidade da mucosa de acordo com a idade.

	5-11 anos	12-15 anos
Índice de Simpson (IC 95%)	0,2111 (0,1821; 0,2402)	0,1577 (0,1318; 0,1835)

Pode concluir-se que a idade não constituiu um factor significativamente determinante na biodiversidade na mucosa.

e) Tipo de leveduras na mucosa de acordo com o gênero

Tabela LXII. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com o gênero.

	♂	♀
Sem leveduras	64 (54,7)	60 (68,2)
<i>C. albicans</i>	44 (37,6)	21 (23,9)
<i>C. railenensis</i>	2 (1,7)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondi</i>	1 (0,9)	2 (2,3)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	1 (0,9)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	3 (2,6)	5 (5,7)

Tabela LXIII. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa de acordo com o gênero.

	♂	♀
Índice de Simpson (IC 95%)	0,1694 (0,1548; 0,1840)	0,4441 (0,4163; 0,4719)

Pode concluir-se que no sexo masculino a biodiversidade de leveduras da mucosa foi significativamente superior.

f) Tipo de leveduras na mucosa de acordo com a área de residência

Tabela LXIV. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com a área de residência.

	Rural	Urbana
Sem leveduras	92 (63,0)	32 (54,2)
<i>C. albicans</i>	46 (31,5)	19 (32,2)
<i>C. railenensis</i>	2 (1,4)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (0,7)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondi</i>	1 (0,7)	2 (3,4)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	1 (0,7)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	1 (0,7)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	2 (1,4)	6 (10,2)

Tabela LXV. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa de acordo com a área de residência.

	Rural	Urbana
Índice de Simpson (IC 95%)	0,1882 (0,1680; 0,2084)	0,1732 (0,1310; 0,2153)

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas relativamente à biodiversidade na mucosa entre as crianças com residência rural e residência urbana.

g) Tipo de leveduras na mucosa de acordo com a frequência de escovagem dentária

	Não escova	≤2x/dia	>2x/dia
Sem leveduras	6 (37,5)	113 (63,5)	5 (45,5)
<i>C. albicans</i>	9 (56,2)	51 (28,7)	5 (45,5)
<i>C. railenensis</i>	0 (0,0)	2 (1,1)	0 (0,0)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondi</i>	0 (0,0)	3 (1,7)	0 (0,0)
<i>C. krusei</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. lipolytica</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
<i>C. parapsylosis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>C. albicans</i> + <i>Filobasidium capsuligenum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sem registo	1 (6,2)	6 (3,4)	1 (9,1)

Tabela LXVI. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com a frequência de escovagem dentária.

Tabela LXVII. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa em relação à frequência de escovagem dentária.

	Não escova	≤2x/dia	>2/dia
Índice (IC 95%)	0,00 (0,00; 0,00)	0,2233 (0,2050; 0,2415)	0,00 (0,00; 0,00)

Foi possível verificar que apenas as crianças com frequência de escovagem ≤2x/dia apresentaram mais do que uma espécie de leveduras na mucosa.

3.2.2.7.1 Tipo de espécies de leveduras na mucosa - *C. albicans* vs espécies

À semelhança do que foi considerado na saliva, e uma vez que a *C. albicans* foi, também na mucosa, a espécie mais frequentemente isolada correlacionou-se a presença desta levedura, face às

restantes, com diferentes variáveis, verificando-se associações estatisticamente significativas na relação da *C. albicans* com outras espécies e:

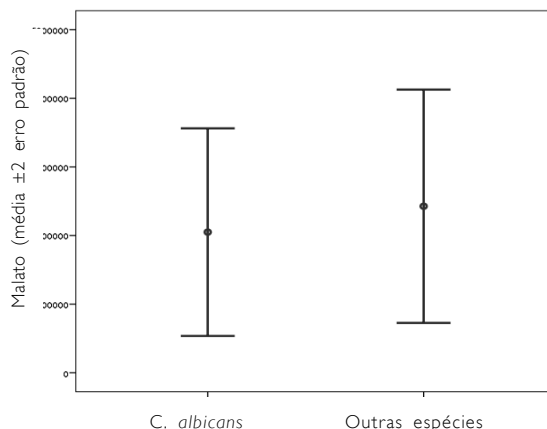
a) o número de refeições diárias (teste exato de Fisher, $p=0,020$); esta associação foi no sentido dos pacientes que cumpriam diariamente menos refeições apresentarem maior frequência de “outras espécies”. A probabilidade dos pacientes que ingeriam mais refeições apresentarem *C. albicans* foi aproximadamente 10x superior: $OR=10,416$ $IC95\% (1,206;90,909)$.

Tabela LXVIII. Relação entre o tipo de espécies de leveduras na mucosa (*C. albicans* vs outras espécies) e o número de refeições diárias.

			≤5/dia	>5/dia
Tipo de leveduras na mucosa	<i>C. albicans</i>	Observações	26	40
		Observações esperadas	29	37
	Outras espécies	Observações	6	1
		Observações esperadas	3	4

b) a concentração salivar de malato (Mann-Whitney, $p=0,012$); observou-se que as crianças com maior prevalência de *C. albicans* na mucosa apresentaram menor concentração salivar de malato.

Gráfico 36. Relação entre o tipo de espécies de leveduras na mucosa (*C. albicans* vs outras espécies) e a concentração salivar de malato.



Inversamente, não se verificaram associações estatisticamente significativas entre o tipo de leveduras na mucosa (*C. albicans* vs outras espécies) na relação com:

- a) a presença de DM (teste exato de Fisher, $p=0,053$);
- b) o controlo metabólico da DM (Mann-Whitney, $p=0,549$) (teste exato de Fisher, $p=0,501$);
- c) ser diabético controlado/ser não diabético (teste exacto de Fisher, $p=0,069$);
- d) ser diabético não controlado/ser não diabético (teste exato de Fisher, $p=0,136$);
- e) a idade (teste exato de Fisher, $p=0,711$);
- f) o género (teste exato de Fisher, $p=0,711$);

- g) a frequência de escovagem dentária (Mann-Whitney, $p=0,686$);
- h) os índices cpo (Teste exato de Fisher, $p=1,0$) e CPO (teste exato de Fisher, $p = 1,0$);
- i) a taxa de fluxo fluxo salivar estimulado (teste exato de Fisher, $p=1,0$);
- j) a carga de leveduras na saliva (teste exato de Fisher, $p=0,074$);
- k) a contagem de linfócitos salivares/10.000 eventos (Mann-Whitney, $p=0,897$);
- l) as subpopulações salivares de CD45+ (Mann-Whitney, $p=0,234$); CD14+ (Mann-Whitney, $p=0,178$); CD3+ (Mann-Whitney, $p=0,346$); CD4+ (Mann-Whitney, $p=0,275$); CD8+ (Mann-Whitney, $p=0,650$);
- m) a concentração de diferentes metabolitos salivares; propionato (Mann-Whitney, $p=0,341$); lactato (Mann-Whitney, $p=0,861$); alanina (Mann-Whitney, $p=0,226$); etanol (Mann-Whitney, $p=0,775$); butirato (Mann-Whitney, $p=0,181$); acetato (Mann-Whitney, $p=0,241$); formato (Mann-Whitney, $p=0,612$).

Desta forma, pode concluir-se que não há rejeição da hipótese nula H_02 : “Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações dos parâmetros microbiológicos orais”.

3.2.3 Questão 3: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações do perfil metabólico salivar?

Para responder a esta questão foi verificada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos clínicos definidos e algumas variáveis relevantes no que se refere à concentração salivar de:

- a. Propionato
- b. Lactato
- c. Alanina
- d. Etanol
- e. Malato
- f. Butirato
- g. Acetato
- h. Formato

3.2.3.1 Propionato

No respeitante à concentração salivar de propionato os testes estatísticos efetuados não permitiram verificar quaisquer associações estatisticamente significativas em relação aos seguintes parâmetros:

- a) presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,437$);
- b) controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,916$)(Mann-Whitney, $p=0,506$);
- c) ser não diabético/diabético controlado (Mann-Whitney, $p=0,436$);
- d) anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,238$);
- e) idade (Mann-Whitney, $p=0,321$);
- f) género (Mann-Whitney, $p=0,389$);
- g) frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,599$);
- h) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,363$) e capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,477$);
- i) os índices CPO (Mann-Whitney, $p=0,673$) e cpo (Mann-Whitney, $p=0,135$).

3.2.3.2 Lactato

De forma semelhante no referente à concentração salivar de lactato não puderam ser observadas quaisquer associações ou diferenças estatisticamente significativas na relação com:

- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,060$);
- b) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,339$)(Mann-Whitney, $p=0,525$);
- c) ser não diabético/diabético controlado (Mann-Whitney, $p=0,194$);
- d) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,702$);

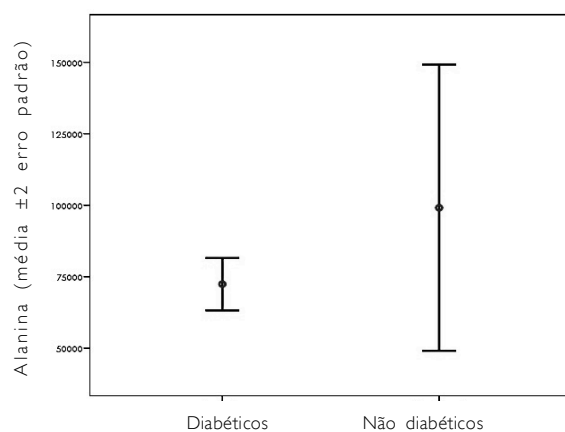
- e) a idade (Mann-Whitney, $p=0,251$);
- f) o género (Mann-Whitney, $p=0,161$);
- g) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,569$);
- h) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,220$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,480$);
- i) os índices CPO (Mann-Whitney, $p=0,947$) e cpo (Mann-Whitney, $p=0,102$).

3.2.3.3 Alanina

Na concentração salivar de alanina puderam, pelo contrário, constatar-se correlações estatisticamente significativas em relação:

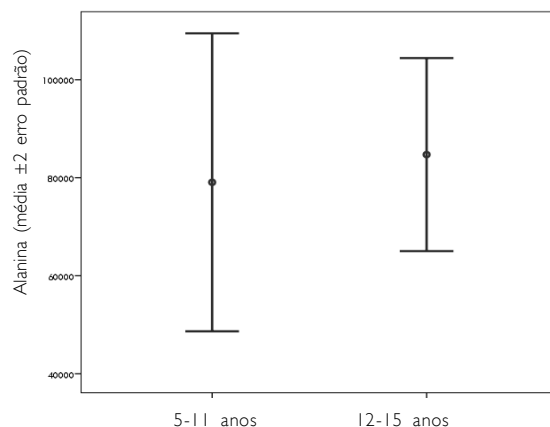
- a) à presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,023$); observou-se que as crianças não diabéticas apresentaram maiores concentrações de alanina na saliva.

Gráfico 37. Relação entre a concentração salivar de alanina e a presença de DM.



- b) à idade (Mann-Whitney, $p=0,009$); observou-se que as crianças mais velhas apresentaram concentrações salivares mais elevadas de alanina.

Gráfico 38. Relação entre a concentração salivar de alanina e os escalões etários.



Inversamente, não se encontraram associações estatisticamente significativas na relação com:

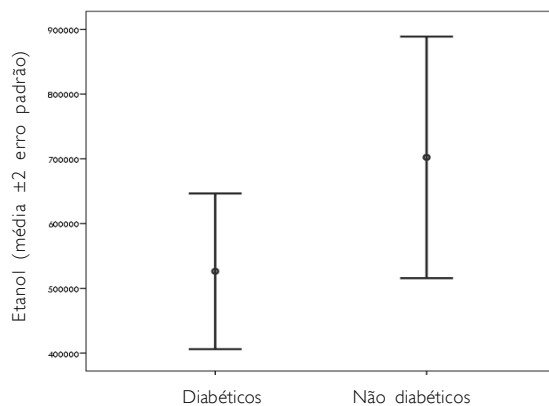
- a) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,556$)(Mann-Whitney, $p= 0,186$);
- b) ser não diabético/diabético controlado (Mann-Whitney, $p=0,085$);
- c) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,062$);
- d) o género (Mann-Whitney, $p=0,242$);
- e) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,970$);
- f) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,237$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,528$);
- g) os índices CPO (Mann-Whitney, $p=0,760$) e cpo (Mann-Whitney, $p=0,428$).

3.2.3.4 Etanol

Foram estatisticamente significativas as associações entre a concentração salivar de etanol e:

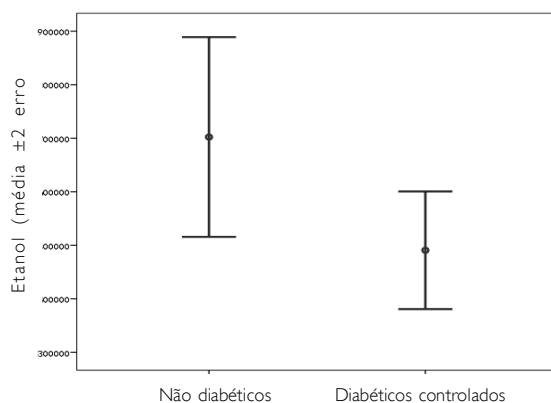
- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,001$); observou-se que as crianças não diabéticas apresentaram maior concentração de etanol na saliva.

Gráfico 39. Relação entre a concentração salivar de etanol e a presença de DM.



- b) ser não diabético/diabético controlado (Mann-Whitney, $p=0,020$); observou-se que as crianças não diabéticas apresentaram maior concentração de etanol na saliva.

Gráfico 40. Relação entre a concentração salivar de etanol e ser não diabético/diabético controlado.



Não foram relevantes, em termos estatísticos, as associações deste metabolito salivar e:

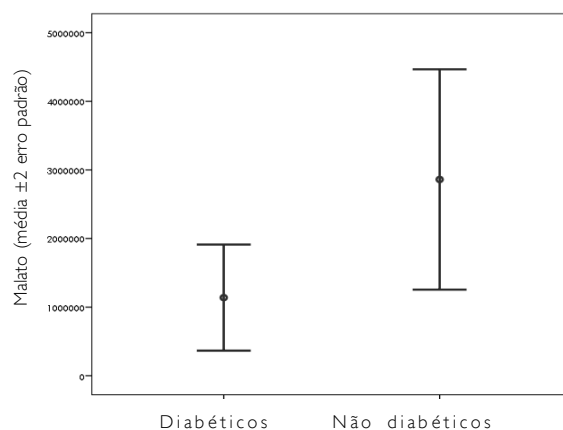
- a) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,658$)(Mann-Whitney, $p=0,731$);
- b) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,698$);
- c) a idade (Mann-Whitney, $p=0,353$);
- d) o género (Mann-Whitney, $p=0,242$);
- e) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,509$);
- f) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,373$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,743$);
- g) os índices CPO (Mann-Whitney, $p=0,842$) e cpo (Mann-Whitney, $p=0,859$).

3.2.3.5 Malato

Determinaram-se associações estatisticamente significativas relativamente à concentração salivar de malato e:

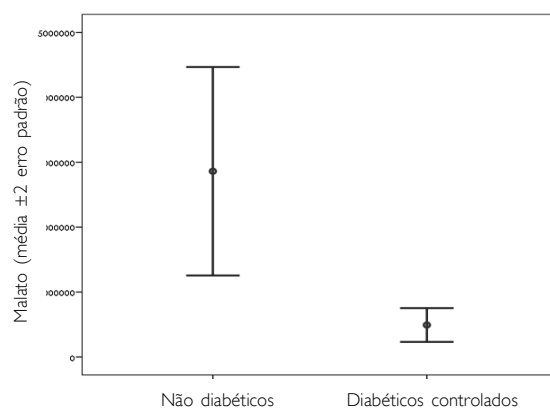
- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p<0,001$); observou-se que as crianças não diabéticas apresentaram maior concentração de malato na saliva.

Gráfico 41. Relação entre a concentração salivar de malato e a presença de DM.



- b) ser não diabético/diabético controlado (Mann-Whitney, $p<0,001$); observou-se que as crianças não diabéticas apresentaram maior concentração de malato na saliva.

Gráfico 42. Relação entre a concentração salivar de malato e ser não diabético/diabético controlado.



Não se encontraram associações estatisticamente significativas na correlação da concentração salivar de malato e:

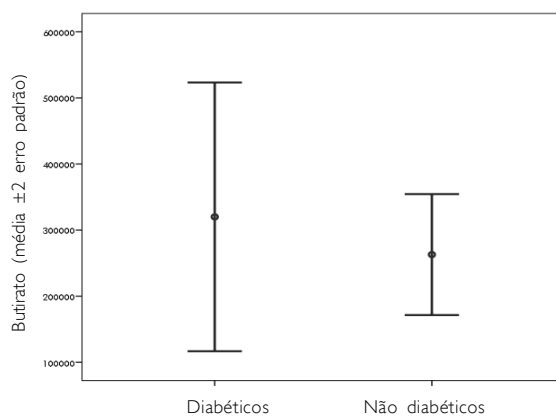
- o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,560$)(Mann-Whitney, $p=0,402$);
- os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,662$);
- a idade (Mann-Whitney, $p = 0,062$);
- o género (Mann-Whitney, $p=0,235$);
- a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,257$);
- a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,573$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,468$);
- os índices CPO (Mann-Whitney, $p=0,141$) e cpo (Mann-Whitney, $p=0,614$).

3.2.3.6 Butirato

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na associação da concentração salivar de butirato com:

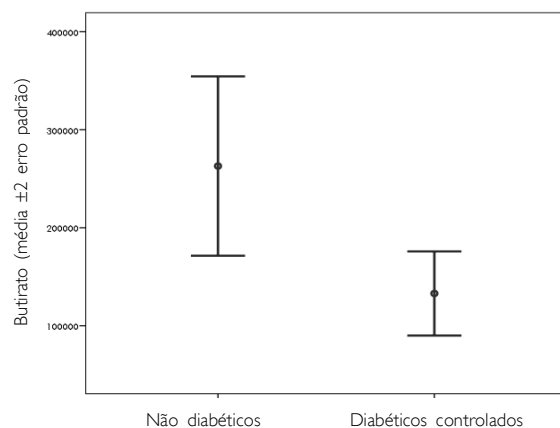
- a presença de DM (Mann-Whitney, $p<0,001$); observou-se que as crianças diabéticas apresentaram maior concentração de butirato na saliva.

Gráfico 43. Relação entre a concentração salivar de butirato e a presença de DM.



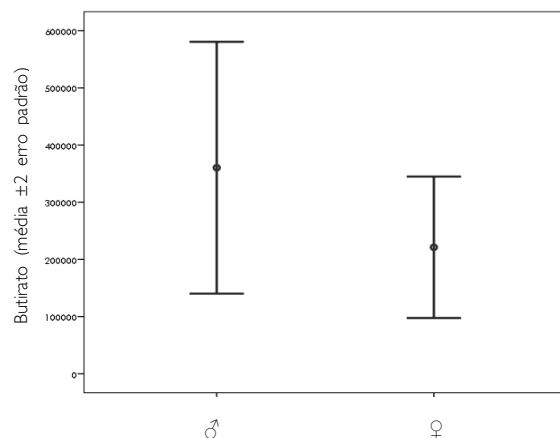
b) ser não diabético/diabético controlado (Mann-Whitney, $p < 0,001$); esta associação foi no sentido das crianças não diabéticas apresentarem maior concentração de butirato na saliva.

Gráfico 44. Relação entre a concentração salivar de butirato e ser não diabético/diabético controlado.



c) o género (Mann-Whitney, $p = 0,013$); esta associação foi no sentido das crianças do género masculino apresentarem maior concentração de butirato na saliva.

Gráfico 45. Relação entre a concentração salivar de butirato e o género.



Não se verificaram associações estatisticamente significativas na relação com:

- o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p = 0,519$) (Mann-Whitney, $p = 0,430$);
- os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p = 0,180$);
- a idade (Mann-Whitney, $p = 0,538$);
- a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p = 0,426$);
- a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p = 0,124$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p = 0,878$);
- os índices CPO (Mann-Whitney, $p = 0,867$) e cpo (Mann-Whitney, $p = 0,922$).

3.2.3.7 Acetato

Não foram detetadas quaisquer associações estatisticamente significativas em relação à concentração salivar de acetato tendo em conta:

- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,425$);
- b) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,912$)(Mann-Whitney, $p=0,674$);
- c) ser não diabético/diabético controlado (Mann-Whitney, $p=0,372$);
- d) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,389$);
- e) a idade (Mann-Whitney, $p=0,504$);
- f) o género (Mann-Whitney, $p=0,436$);
- g) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,996$);
- h) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,700$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,351$);
- i) os índices CPO (Mann-Whitney, $p=0,760$) e cpo (Mann-Whitney, $p=0,499$).

3.2.3.8 Formato

Não foram detetadas quaisquer associações estatisticamente significativas em relação à concentração salivar de formato e:

- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,122$);
- b) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,538$) (Mann-Whitney, $p=0,823$);
- c) ser não diabético/diabético controlado (Mann-Whitney, $p=0,129$);
- d) anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,960$);
- e) a idade (Mann-Whitney, $p=0,162$);
- f) o género (Mann-Whitney, $p=0,630$);
- g) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,278$);
- h) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,135$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,869$);
- i) os índices CPO (Mann-Whitney, $p=0,257$) e cpo (Mann-Whitney, $p=0,551$).

Desta forma, pode concluir-se que há rejeição da hipótese nula H_03 : “Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações do perfil metabólico salivar”.

3.2.4 Questão 4: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros imunoinflamatórios salivares?

Para responder à questão, e seguindo o mesmo esquema de análise adoptado anteriormente, indagaram-se possíveis diferenças/associações estatisticamente significativas entre os três subgrupos clínicos e algumas variáveis relevantes no referente à quantificação salivar das subpopulações de:

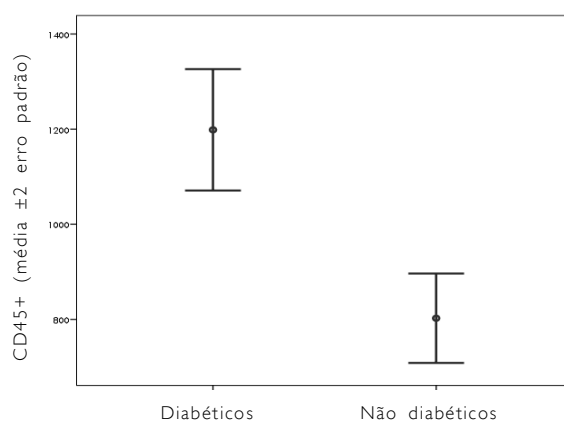
- CD45+
- Linfócitos
- Granulócitos CD45+CD14-CD3-
- CD14+
- CD3+
- CD3+CD4+
- CD3+CD8+

3.2.4.1 CD45+

Verificaram-se associações/diferenças com relevância estatística relativamente à subpopulação salivar de CD45+ e:

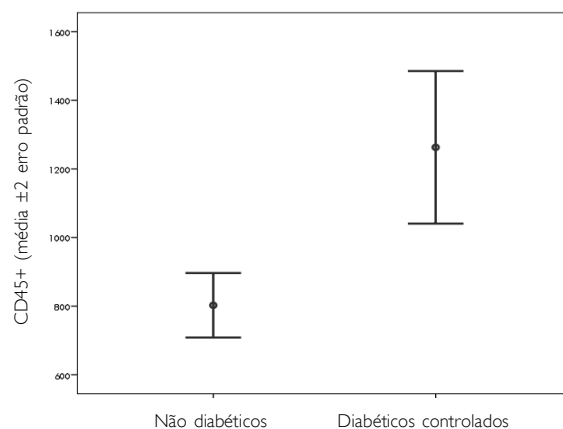
- a presença de DM (Mann-Whitney, $p < 0,0001$); observou-se que as crianças diabéticas apresentaram níveis mais elevados de CD45+ na saliva.

Gráfico 46. Relação entre a presença de DM e a subpopulação salivar de CD45+.



- ser diabético controlado/ser não diabético (Mann-Whitney, $p < 0,0001$); esta associação foi no sentido das crianças diabéticas controladas apresentarem níveis mais elevados CD45+ na saliva.

Gráfico 47. Relação entre a subpopulação salivar de CD45+ e ser diabético controlado/ser não diabético.



Paralelamente, e ainda que de forma menos marcada, verificaram-se associações em relação às concentrações salivares de:

c) propionato (Coeficiente de Spearman=0,197, $p=0,005$), acetato (Coeficiente de Spearman=0,195, $p=0,005$) e formato (Coeficiente de Spearman=0,161, $p=0,021$); esta associação foi no sentido das crianças com maior intensidade de CD45+ na saliva evidenciarem maiores concentrações destes metabolitos.

Pelo contrário, não se demonstraram significativas as correlações/diferenças significativas na concentração salivar de CD45+ na relação com:

- a) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,314$)(Mann-Whitney, $p=0,189$);
- b) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,145$);
- c) a idade (Mann-Whitney, $p=0,078$);
- d) o género (Mann-Whitney, $p=0,727$);
- e) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,216$);
- f) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,655$) e a capacidade tampão salivar (Kruskal-Wallis, $p=0,637$);
- g) as concentrações salivares de lactato (teste de correlação)($p=0,896$), alanina ($p=0,162$), etanol ($p=0,853$), malato ($p=0,284$) e butirato ($p=0,467$).

3.2.4.2 Linfócitos

Verificou-se serem estatisticamente significativas, ainda que de forma pouco marcada, apenas as associações entre a contagem de linfócitos salivares (n° de células/10.000 eventos) e as concentrações salivares de:

- a) etanol (Coeficiente de Spearman=0,254, $p<0,001$);

- b) butirato (Coeficiente de Spearman=0,144, $p=0,040$);
- c) acetato (Coeficiente de Spearman=0,181, $p=0,010$);
- d) formato (Coeficiente de Spearman=0,139, $p=0,048$);

Não puderam ser verificadas associações significativas considerando as variáveis:

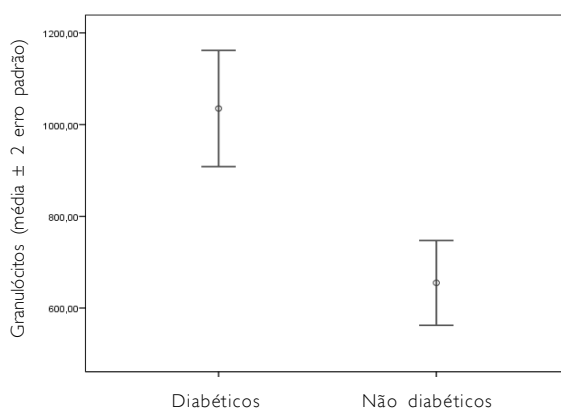
- a) presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,508$);
- b) controlo metabólico da DM ($p=0,160$) (Mann-Whitney, $p=0,109$);
- c) ser diabético controlado/ser não diabético (Mann-Whitney, $p=0,788$);
- d) anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,667$);
- e) idade (Mann-Whitney, $p=0,356$);
- f) género (Mann-Whitney, $p=0,269$);
- g) frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,680$);
- h) taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,910$) e capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,432$);
- i) concentração salivar dos metabolitos: propionato ($p=0,080$); lactato ($p=0,302$); alanina ($p=0,734$); malato ($p=0,930$).

3.2.4.3 Granulócitos CD45+CD14-CD3-

Verificaram-se associações/diferenças com relevância estatística relativamente à subpopulação salivar de granulócitos e:

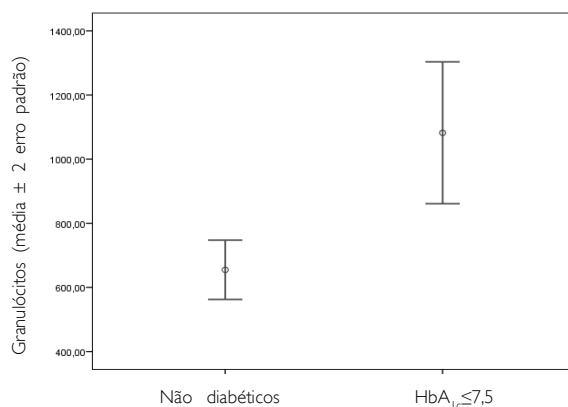
- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p<0,001$); observou-se que as crianças diabéticas apresentaram níveis mais marcados de granulócitos na saliva.

Gráfico 48. Relação entre a subpopulação salivar de granulócitos e a presença de DM..



- b) ser diabético controlado e ser não diabético (Mann-Whitney, $p<0,001$); observou-se que as crianças diabéticas controladas apresentaram níveis mais elevados de granulócitos na saliva.

Gráfico 49. Relação entre a subpopulação salivar de granulócitos e ser diabético controlado/não diabético.



Paralelamente, e ainda que de forma menos marcada, verificaram-se associações em relação às concentrações salivares de:

c) propionato (Coeficiente de Spearman=0,200, $p=0,004$), acetato (Coeficiente de Spearman=0,191, $p=0,006$) e formato (Coeficiente de Spearman=0,152, $p=0,031$); esta associação foi no sentido das crianças com acentuação de granulócitos na saliva evidenciarem maiores concentrações destes metabolitos.

Não se apresentaram significativas as correlações/diferenças na subpopulação salivar de granulócitos na relação com:

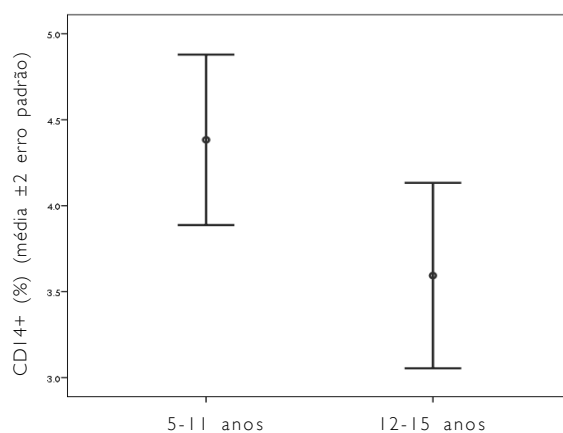
- a) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,558$; Mann-Whitney, $p=0,922$);
- b) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,599$);
- c) o género (Mann-Whitney, $p=0,677$);
- d) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,305$);
- e) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,499$) e a capacidade tampão salivar (Kruskal-Wallis, $p=0,576$);
- f) as concentrações salivares de lactato ($p=0,995$), alanina ($p=0,119$), etanol ($p=0,572$), malato ($p=0,207$) e butirato ($p=0,424$).

3.2.4.4 CD14+

Determinaram-se associações/diferenças estatisticamente significativas entre a subpopulação salivar de CD14+ e:

- a) a idade (Mann-Whitney, $p=0,006$); observou-se que as crianças mais jovens apresentaram uma maior percentagem de CD14+ na saliva.

Gráfico 50. Relação entre a subpopulação salivar de CD14+ e os escalões etários.



b) as concentrações salivares de propionato (Coeficiente de Spearman=-0,174, $p=0,013$), acetato (Coeficiente de Spearman=-0,168, $p=0,016$) e formato (Coeficiente de Spearman=-0,144, $p=0,040$); estas associações, ainda que fracas, foram no sentido das crianças com maior percentagem de CD14+ na saliva apresentarem menores concentrações salivares destes metabolitos.

Sem diferenças estatisticamente significativas foram as associações da percentagem de CD14+ na saliva com:

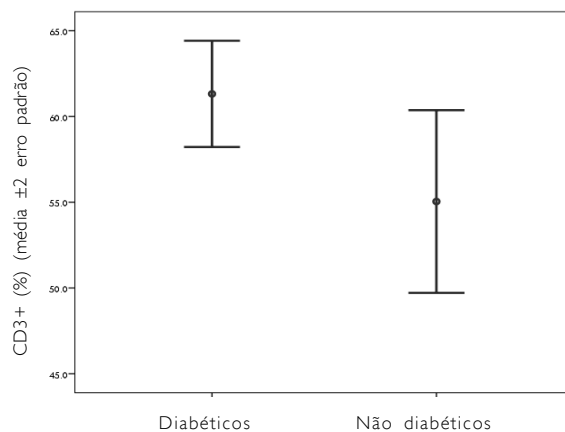
- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,564$);
- b) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,086$) (Mann-Whitney, $p=0,255$);
- c) ser diabético controlado/ser não diabético (Mann-Whitney, $p=0,724$);
- d) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,136$);
- e) o género (Mann-Whitney, $p=0,794$);
- f) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,349$);
- g) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,894$) e a capacidade tampão salivar (Kruskal-Wallis, $p=0,851$);
- h) os índices CPO (Mann-Whitney, $p=0,130$) e cpo (Mann-Whitney, $p=0,559$);
- i) as concentrações salivares de: lactato ($p=0,646$), alanina ($p=0,224$), etanol ($p=0,367$), malato ($p=0,211$) e butirato ($p=0,075$).

3.2.4.5 CD3+

Foram encontradas correlações estatisticamente significativas da subpopulação salivar de CD3+ relativamente:

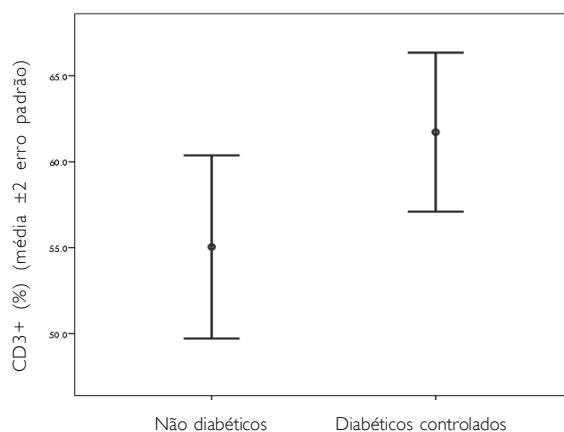
- a) à presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,023$); observou-se que as crianças diabéticas apresentaram uma maior percentagem da subpopulação salivar de CD3+.

Gráfico 51. Relação entre a subpopulação salivar de CD3+ e a presença de DM.



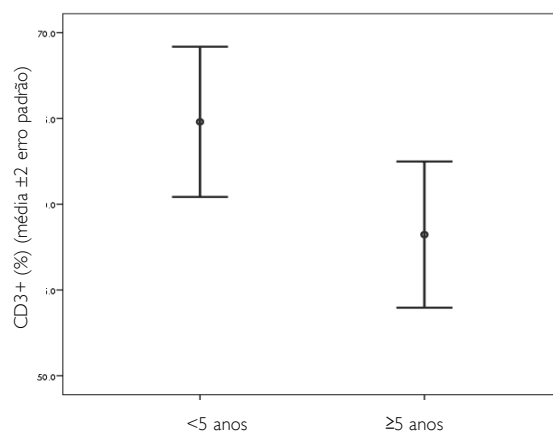
b) ser diabético controlado/ser não diabético (Mann-Whitney, $p=0,048$); observou-se que as crianças diabéticas controladas apresentaram uma maior percentagem de CD3+ na saliva.

Gráfico 52. Relação entre a subpopulação salivar de CD3+ e ser diabético controlado/ser não diabético.



c) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,029$); observou-se que as crianças com menor duração da DM apresentaram uma maior percentagem de CD3+ na saliva.

Gráfico 53. Relação entre a subpopulação salivar de CD3+ e os anos decorridos desde o diagnóstico da DM.



d) Paralelamente, e ainda que de forma estatisticamente menos significativa, verificaram-se associações entre a concentração salivar de CD3+ e a concentração salivar de: etanol (Coeficiente de Spearman=-0,214, $p=0,002$), malato (Coeficiente de Spearman=-0,208, $p=0,003$), butirato (Coeficiente de Spearman=-0,201, $p=0,004$); estas associações foram no sentido das crianças com maior percentagem de CD3+ na saliva apresentarem menores concentrações salivares destes metabolitos.

Por outro lado, não se verificaram diferenças/associações estatisticamente significativas desta subpopulação celular na relação com:

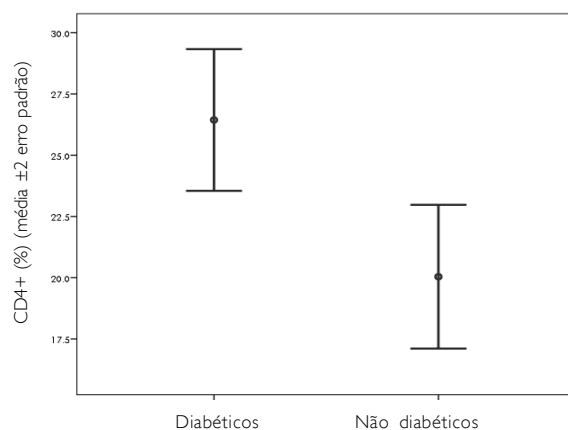
- a) o controlo metabólico da DM (teste de correlação, $p=0,219$)(Mann-Whitney, $p=0,126$);
- b) a idade (Mann-Whitney, $p=0,811$);
- c) o género (Mann-Whitney, $p=0,062$);
- d) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,386$);
- e) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,069$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,490$);
- f) as concentrações salivares de: propionato ($p=0,113$), lactato ($p=0,122$), alanina ($p=0,183$), acetato ($p=0,051$) e formato ($p=0,094$).

3.2.4.6 CD3+CD4+

Determinaram-se diferenças/associações estatisticamente significativas na relação da percentagem de CD4+ na saliva com:

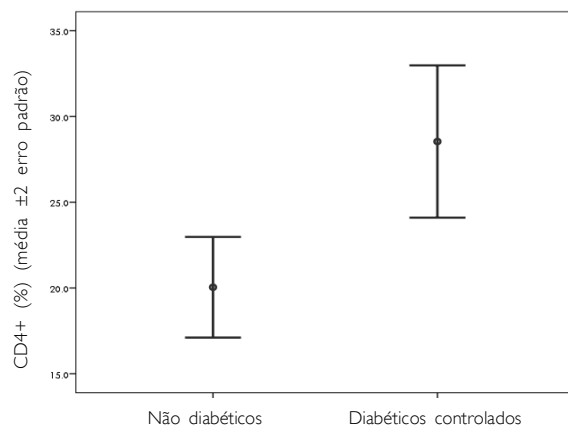
- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,007$); observou-se que as crianças diabéticas apresentaram maior percentagem de CD4+ na saliva.

Gráfico 54. Relação entre a subpopulação salivar de CD4+ e a presença de DM.



- b) ser diabético controlado/ser não diabético (Mann-Whitney, $p=0,002$); observou-se que as crianças diabéticas controladas apresentaram maior percentagem de CD4+ na saliva.

Gráfico 55. Relação entre a subpopulação salivar de CD4+ e ser diabético controlado/ser não diabético.



c) o controlo metabólico da DM (Coeficiente de Spearman=-0,235, $p=0,007$)(Mann-Whitney, $p=0,002$); esta associação, todavia fraca, foi no sentido das crianças com melhor controlo metabólico da DM apresentarem menor percentagem de CD4+ na saliva.

d) a concentração salivar de butirato (Coeficiente de Spearman=-0,152, $p=0,030$); esta associação, todavia fraca, foi no sentido das crianças com maior concentração salivar deste metabolito apresentarem menor percentagem de CD4+ na saliva.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a percentagem de CD4+ na saliva e:

- a) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p=0,277$);
- b) a idade (Mann-Whitney, $p=0,910$);
- c) o género (Mann-Whitney, $p=0,392$);
- d) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,440$);
- e) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,897$) e a capacidade tampão da saliva (Kruskal-Wallis, $p=0,230$);
- f) as concentrações salivares de propionato ($p=0,394$), lactato ($p=0,960$), alanina ($p=0,312$), etanol ($p=0,640$), malato ($p=0,236$), acetato ($p=0,196$) e formato ($p=0,981$).

3.2.4.7 CD3+CD8+

No referente à percentagem, na saliva, da subpopulação de CD8+, apenas puderam ser constatadas associações estatisticamente significativas, mas pouco marcadas, no que concerne às concentrações salivares de:

- a) lactato (Coeficiente de Spearman=-0,144, $p=0,040$), alanina (Coeficiente de Spearman=-0,186, $p=0,008$), etanol (Coeficiente de Spearman=-0,160, $p=0,023$), malato (Coeficiente de

Spearman=-0,239, $p=0,001$) e acetato (Coeficiente de Spearman=-0,146, $p=0,038$); estas associações foram no sentido das crianças com maior concentração destes metabolitos apresentarem menor percentagem de CD8+ na saliva.

Sem qualquer relevância estatística foram as associações desta subpopulação celular com:

- a) a presença de DM (Mann-Whitney, $p=0,872$);
- b) o controlo metabólico da DM ($p=0,442$) (Mann-Whitney, $p=0,971$);
- c) ser diabético controlado/ser não diabético (Mann-Whitney, $p=0,618$);
- d) os anos decorridos desde o diagnóstico da DM (Mann-Whitney, $p = 0,067$);
- e) a idade (Mann-Whitney, $p=0,485$);
- f) o género (Mann-Whitney, $p=0,258$);
- g) a frequência de escovagem dentária (Kruskal-Wallis, $p=0,547$);
- h) a taxa de fluxo salivar estimulado (Mann-Whitney, $p=0,332$) e a capacidade tampão salivar (Kruskal-Wallis, $p=0,139$);
- i) a concentração salivar de propionato ($p=0,317$), butirato ($p=0,177$) e formato ($p=0,369$).

Desta forma, pode concluir-se que há rejeição da hipótese nula - H_0 : “Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações dos parâmetros imunoinflamatórios salivares”.

3.2.5 Questão 5: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos potenciais fatores de risco ambientais/comportamentais e/ou fisiológicos para o desenvolvimento de patologia oral?

Foi analisada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos clínicos e algumas variáveis consideradas relevantes no que se refere aos seguintes parâmetros:

- a) residência
- b) nível de formação dos progenitores
- c) frequência de escovagem dentária
- d) auxílio na escovagem dentária
- e) idade da primeira consulta de Medicina Dentária
- f) número de refeições diárias
- g) frequência de consumo de guloseimas
- h) presença de selantes de fissuras
- i) idade
- j) género
- k) presença de má oclusão
- l) taxa de fluxo salivar estimulado
- m) capacidade tampão salivar

3.2.5.1 Residência

Não foram constatadas quaisquer associações estatisticamente significativas entre o local de residência e:

- a) presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,229$);
- b) o controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,162$).

3.2.5.2 Nível de formação dos progenitores

Não foram constatadas quaisquer associações estatisticamente significativas entre o nível de formação dos progenitores e a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,236$).

Pelo contrário, foi determinada uma relação estatisticamente significativa (Chi-quadrado, $p=0,001$) relativamente ao controlo metabólico da DM; neste caso as crianças em que pelo menos um dos pais possuía formação superior apresentaram um melhor controlo metabólico da doença.

Tabela LXIX. Relação entre o nível de formação dos progenitores e o controle metabólico da DM.

			HbA _{1c} ≤7,5	HbA _{1c} >7,5
Formação superior dos progenitores	Ambos sem	Observações	36	63
		Observações esperadas	45	54
	Um dos pais com	Observações	13	6
		Observações esperadas	9	10
	Ambos com	Observações	12	3
		Observações esperadas	7	8

3.2.5.3 Frequência de escovagem dentária

Foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a frequência de escovagem dentária e:

a) o controle metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,012$); esta associação foi no sentido dos pacientes que apresentavam HbA_{1c} ≤7,5 cumprirem um menor número de escovagens dentárias diárias.

Tabela LXX. Relação entre a frequência de escovagem dentária e o controle metabólico da DM.

			Não escova	≤2x/dia	>2x dia
HbA _{1c}	≤7,5	Observações	1	56	4
		Observações esperadas	6	51	5
	>7,5	Observações	12	54	6
		Observações esperadas	7	60	5

b) ser não diabético/diabético não controlado; não se verificou uma tendência definida e tendo por base as regras de Cochran não foi avaliada a significância estatística.

Tabela LXXI. Relação entre a frequência de escovagem dentária e ser não diabético/diabético não controlado.

		Não escova	≤2x/dia	>2x dia
Não diabético	Observações	3	68	1
	Observações esperadas	7	61	4
HbA _{1c} > 7,5	Observações	12	68	8
	Observações esperadas	8	75	5

Não se revelaram estatisticamente significativas as associações da frequência de escovagem dentária e:

a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,057$);

b) ser não diabético/diabético controlado; não se verificou uma tendência definida e, tendo por base as regras de Cochran, não foi avaliada a significância estatística.

3.2.5.5 Auxílio/supervisão na escovagem dentária

Não se constataram associações estatisticamente significativas (Chi-quadrado, $p=0,349$) entre o auxílio/supervisão na escovagem e a presença de DM.

3.2.5.6 Idade da 1ª consulta de Medicina Dentária

Não se constataram associações estatisticamente significativas (Chi-quadrado, $p=0,079$) entre a idade da 1ª consulta de Medicina Dentária e a presença de DM.

3.2.5.7 Número de refeições cumpridas diariamente

Puderam verificar-se associações estatisticamente significativas na relação entre o número de refeições diárias e:

a) presença de DM (Chi-quadrado, $p<0,0001$); esta associação foi no sentido dos pacientes com menor número de refeições por dia integrarem o grupo dos não diabéticos. A probabilidade dos indivíduos que faziam mais do que 5 refeições diárias pertencerem ao grupo dos diabéticos foi aproximadamente 6x superior: OR=6,289, IC 95% (3,344; 11,905).

Tabela LXXII. Relação entre nº de refeições diárias e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
Número de refeições diárias	≤5	Observações	51	37
		Observações esperadas	31	57
	>5	Observações	21	96
		Observações esperadas	41	76

b) ser não diabético/diabético controlado (Chi-quadrado, $p<0,0001$); esta associação foi no sentido dos pacientes que cumpriam menos refeições por dia (≤ 5) serem os não diabéticos. A probabilidade de os indivíduos que efetuavam mais do que 5 refeições diariamente serem diabéticos controlados foi aproximadamente 7x superior: OR=6,830, IC95% (3,182; 14,664).

Tabela LXXIII. Relação entre nº de refeições diárias e ser diabético controlado/não diabético.

			Não diabéticos	HbA _{1c} ≤7,5
Número de refeições diárias	≤5	Observações	16	51
		Observações esperadas	31	36
	>5	Observações	45	21
		Observações esperadas	30	36

c) ser não diabético/diabético não controlado (Chi-quadrado, $p<0,0001$); esta associação foi no sentido dos pacientes que cumpriam um menor número de refeições diárias serem os não diabéticos. A

probabilidade dos indivíduos que faziam mais do 5 refeições serem diabéticos não controlados foi aproximadamente 6x superior: OR=6,476, IC95% (3,243;12,933).

Tabela LXXIV. Relação entre número de refeições diárias e ser diabético não controlado/ser não diabético.

			Não diabéticos	HbA _{1c} >7,5
			Número de refeições diárias	≤5
Observações esperadas	34	41		
>5	Observações	21		64
	Observações esperadas	38		47

O número de refeições não apresentou, todavia, relação com o controlo metabólico da doença (Chi-quadrado, p=0,706).

3.2.5.8 Frequência de consumo de guloseimas

No que concerne à frequência de consumo de guloseimas foi possível verificar relações estatisticamente significativas com:

a) a presença de DM (Chi-quadrado, p=0,001); esta associação foi no sentido dos pacientes que consomem guloseimas com menor frequência serem os diabéticos.

Tabela LXXV. Relação entre a frequência do consumo de guloseimas e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
			Frequência de consumo de guloseimas	≤1x/semana
Observações esperadas	43	79		
>1x /semana	Observações	26		45
	Observações esperadas	25		46
diariamente	Observações	12		1
	Observações esperadas	5		8

b) ser não diabético/diabético controlado (Chi-quadrado, p=0,001); esta associação foi no sentido dos pacientes com menor consumo de guloseimas serem diabéticos controlados.

Tabela LXXVI. Relação entre a frequência do consumo de guloseimas e ser diabético controlado/ não diabético

			Não diabético	HbA _{1c} ≤7,5
			Frequência de consumo de guloseimas	≤1x/semana
Observações esperadas	42	36		
>1x /semana	Observações	26		17
	Observações esperadas	23		20
diariamente	Observações	12		0
	Observações esperadas	7		6

c) ser não diabético/diabético não controlado (Chi-quadrado, $p=0,001$); esta associação foi no sentido dos pacientes que consumiam guloseimas com menor frequência serem os diabéticos não controlados.

Tabela LXXVII. Relação entre a frequência do consumo de guloseimas e ser diabético não controlado/não diabético.

			Não diabético	HbA _{1c} >7,5
Frequência de consumo de guloseimas	≤1x/semana	Observações	34	54
		Observações esperadas	40	48
	>1x /semana	Observações	26	33
		Observações esperadas	27	33
	diariamente	Observações	12	1
		Observações esperadas	7	7

Não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa na relação desta variável com o controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,245$).

3.2.5.9 Presença de selantes de fissuras

Não pode ser constatada qualquer diferença significativa entre os grupos diabéticos/não diabéticos relativamente à presença de selantes de fissuras (Chi-quadrado, $p=0,309$).

3.2.5.10 Idade

A análise deste parâmetro foi estatisticamente relevante, na correlação com:

a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,003$); esta associação foi no sentido dos pacientes de menor idade pertencerem com maior frequência ao grupo dos não diabéticos. A probabilidade das crianças mais velhas serem diabéticas foi aproximadamente 3x superior: OR=2,591, IC95% (1,420;4,739).

Tabela LXXVIII. Relação entre a idade e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
Idade	5-11 anos	Observações	51	24
		Observações esperadas	34	41
	12-15 anos	Observações	21	64
		Observações esperadas	38	47

b) o controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,023$); esta associação foi no sentido dos pacientes mais novos apresentarem com maior frequência $HbA_{1c} \leq 7,5$. A probabilidade das crianças entre os 12-15 anos apresentarem $HbA_{1c} > 7,5$ foi aproximadamente 2x superior: OR=2,228, IC95% (1,109;4,475).

Tabela LXXIX. Relação entre a idade e o controlo metabólico da DM.

			$HbA_{1c} \leq 7,5$	$HbA_{1c} > 7,5$
Idade	5-11 anos	Observações	34	26
		Observações esperadas	28	33
	12-15 anos	Observações	27	46
		Observações esperadas	33	39

c) ser não diabético/diabético não controlado (Chi-quadrado, $p<0,001$); esta associação foi no sentido dos pacientes de menor idade pertencerem com maior frequência ao grupo dos saudáveis; a probabilidade dos indivíduos mais velhos (12-15 anos) serem diabéticos não controlados foi aproximadamente 3x superior: OR=3,226, IC95% (1,678;6,204);

Tabela LXXX. Relação entre a idade e ser diabético não controlado/não diabético.

			Não diabéticos	$HbA_{1c} > 7,5$
Idade	5-11 anos	Observações	49	35
		Observações esperadas	38	46
	12-15 anos	Observações	23	53
		Observações esperadas	34	42

Não se verificou, paralelamente, uma associação estatisticamente significativa entre a idade e ser não diabético/diabético controlado (Chi-quadrado, $p=0,144$).

3.2.5.11 Género

Verificou-se existirem associações estatisticamente significativas entre o género e:

a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,041$); esta associação foi no sentido dos pacientes do género masculino pertencerem com maior frequência ao grupo dos saudáveis. A probabilidade das crianças do género feminino serem diabéticas foi aproximadamente 2x superior: OR=1,855, IC95% (1,021;3,367).

Tabela LXXXI. Relação entre o género e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
Género	♂	Observações	48	69
		Observações esperadas	41	76
	♀	Observações	24	64
		Observações esperadas	31	57

b) ser não diabético/diabético não controlado (Chi-quadrado, $p=0,048$); esta associação foi no sentido das crianças do género masculino pertencerem com maior frequência ao grupo dos saudáveis. A probabilidade das crianças do género feminino serem diabéticas não controladas foi aproximadamente 2x superior: OR=1,911, IC95% (1,004;3,639).

Tabela LXXXII. Relação entre o género e ser diabético não controlado/não diabético.

			Não diabéticos	HbA _{1c} > 7,5
Género	♂	Observações	48	45
		Observações esperadas	42	51
	♀	Observações	24	43
		Observações esperadas	30	37

Pelo contrário, não foi verificada significância estatística na correlação do género com:

- a) o controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,902$);
- b) ser não diabético/diabético controlado (Chi-quadrado, $p=0,095$).

3.2.5.12 Má oclusão

Foi verificada uma correlação significativa entre a presença de má oclusão e a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,032$); esta associação foi no sentido dos pacientes sem má oclusão integrarem mais frequentemente o grupo dos diabéticos; a probabilidade dos indivíduos com má oclusão pertencerem ao grupo dos saudáveis foi aproximadamente 2x superior: OR=1,912, IC95% (1,053;3,472).

Tabela LXXXIII. Relação entre a má oclusão e a presença de DM.

			Não diabéticos	Diabéticos
Má oclusão	Sim	Observações	48	68
		Observações esperadas	41	75
	Não	Observações	24	65
		Observações esperadas	31	58

3.2.5.13 Fluxo salivar estimulado

Não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre os valores do fluxo salivar estimulado e:

- a) a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,539$);
- b) o controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p = 0,772$);
- c) ser não diabético/diabético controlado (Chi-quadrado, $p=0,712$);
- d) ser não diabético/diabético não controlado (Chi-quadrado, $p=0,365$).

3.2.5.14 Capacidade tampão salivar

No que respeita à capacidade tampão salivar foi possível verificar uma correlação estatisticamente relevante relativamente a ser diabético controlado/não diabético; não se verificou uma tendência definida e, tendo por base as regras de Cochran, não foi avaliada a significância estatística.

Tabela LXXXIV. Relação entre a capacidade tampão salivar e ser diabético controlado/não diabético.

			Não diabético	HbA _{1c} ≤7,5
Capacidade tampão salivar	Baixa	Observações	6	2
		Observações esperadas	4	4
	Média	Observações	22	10
		Observações esperadas	17	15
	Alta	Observações	43	49
		Observações esperadas	50	43

Não se determinaram associações estatisticamente significativas desta variável e:

- a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,143$);
- o controlo metabólico da DM (Chi-quadrado, $p=0,092$);
- ser não diabético/ser diabético não controlado (Chi-quadrado, $p=0,365$).

Desta forma, pode concluir-se que há rejeição da hipótese nula - H_0 : “Nas crianças a DM tipo I não está associada a alterações dos potenciais fatores de risco ambientais/comportamentais e/ou fisiológicos para o desenvolvimento de patologia oral”.

4. Discussão

4.1 Análise global dos resultados

A DM tipo I é, reconhecidamente, uma das doenças crónicas mais comuns na infância e a sua incidência aumentou de forma surpreendente na última década ¹⁰⁸³⁻¹⁰⁸⁵. Esta tendência reflete alterações relacionadas com a exposição a diferentes agentes ambientais, os quais se torna fundamental avaliar para esclarecer qual o potencial evolutivo, não podendo apenas ser explicada tendo por base uma influência genética. A investigação epidemiológica levada a cabo mais recentemente tem-se centralizado em várias teorias que constituem hipóteses explicativas, de maior ou menor grau de evidência, referenciando como fatores de risco o possível papel de infeções, tipo de dieta infantil precocemente instituída, exposição a vitamina D, poluentes ambientais, obesidade e resistência à insulina ^{1083, 1085-1088}.

Este acréscimo de incidência da doença, a par do decréscimo da idade em que é diagnosticada, resultará paralelamente num incremento da sua duração, acompanhado de um eventual aumento da frequência de complicações micro e macrovasculares, sobretudo nos casos em que esta tendência não possa ser contrariada pela regularização dos valores de glicemia ¹⁰⁸⁹. O diagnóstico rápido e inequívoco da DM é, pois, um dos pontos chave para evitar o aparecimento destas complicações e, apesar de se tratar de uma doença extremamente complexa, é essencialmente determinado pela medida de um único biomarcador, a glicose ¹⁶². A determinação do grau de controlo metabólico, que habitualmente se considera refletido nos percentuais da HbA_{1c} poderá, porém, estar algo condicionada pelo facto destes constituírem valores médios referentes aos últimos três meses do curso da doença, não demonstrando verdadeiramente os aspectos cumulativos (AGEs) referentes à maior ou menor duração da mesma ¹⁵⁵.

No presente estudo foram avaliadas 133 crianças diabéticas; no grupo etário considerado, e tendo em conta o *cut-off* definido para o controlo metabólico, foi possível verificar que a maior parte (n=88) apresentava um valor percentual de HbA_{1c}>7,5, ainda que destas poder-se-ia considerar um intervalo de valores de HbA_{1c} entre 7,6 e 8,5 correspondente aos “moderadamente controlados” habitualmente considerados *borderline*. A duração média da doença nas crianças diabéticas foi cerca de 5 anos (5,2±3,4) e o valor médio da hemoglobina glicosilada 8,19±1,42, aspectos eventualmente determinantes na ocorrência de patologias secundárias, orais inclusive. De forma coincidente alguns destes dados foram apresentados num estudo publicado em 2004 pela Sociedade Portuguesa de Endocrinologia e Diabetologia Pediátrica, com o objetivo de avaliar os padrões de controlo glicémico, a prevalência das complicações e as modalidades de tratamento numa amostra representativa de diabéticos tipo I (com diagnóstico até aos 22 anos de idade); demonstrou-se que a maioria apresentava um mau controlo metabólico e o objetivo da normoglicemia apenas foi conseguido num número reduzido de doentes ¹⁰⁹⁰.

Através da análise dos resultados obtidos foi igualmente constatado que nesta amostra em estudo a idade das crianças pode constituir um factor importante no controlo metabólico da DM, com diferenças estatisticamente significativas nesta associação (Chi-quadrado, p=0,023); a tendência verificou-se no sentido dos pacientes mais novos apresentarem um melhor controlo metabólico. Alguns autores referem, a este mesmo propósito, que o controlo metabólico tende, efetivamente, a deteriorar-se ao

longo da adolescência, embora não seja passível de generalização em todos os casos com diagnóstico de DM ¹⁰⁹¹⁻¹⁰⁹³.

A adolescência é um dos períodos da vida em que ocorrem alterações relevantes a nível psicológico e fisiológico ¹⁰⁹³. De forma particular as crianças nas fases de pré-adolescência e adolescência são confrontadas com a necessidade de adotarem estilos de vida consonantes com a presença de uma doença crónica, requerendo uma autogestão das práticas alimentares, de exercício físico e ajuste das doses terapêuticas, paralelamente à consolidação da sua autoestima e autoidentidade. Estas consideráveis demandas nem sempre são cumpridas na íntegra, podendo refletir-se negativamente no controlo glicémico ou mesmo na qualidade de vida ¹⁰⁹³⁻¹⁰⁹⁶. Especificamente em relação a este último ponto, a perda latente da qualidade de vida parece estar hipoteticamente associada, para além do aumento da idade e pior controlo metabólico da doença (maior frequência de episódios de hipoglicemia), a estratos socioeconómicos mais desfavorecidos, baixos níveis de instrução e distúrbios depressivos; é referida ainda na literatura uma influência do género (feminino), corroborada igualmente nos resultados do presente estudo, em que se verificou que a probabilidade das crianças do género feminino serem diabéticas não controladas foi aproximadamente 2 vezes maior: OR=1,911, IC95% (1,004;3,639) ¹⁰⁹⁵⁻¹⁰⁹⁸.

Nesta sequência, o nível de formação/grau de literacia dos cuidadores das crianças diabéticas poderá influenciar decisivamente o seu grau de controlo metabólico ^{1099, 1100}. Está descrito que a melhoria do nível socioeconómico e de conhecimento dos pais (sobretudo da mãe) confere vantagens significativas neste domínio, diminuindo igualmente a probabilidade de ocorrência de complicações associadas ^{1097, 1099}. Em consonância, foi possível verificar no presente trabalho a existência de uma associação estatisticamente significativa (Chi-quadrado, $p=0,001$) entre o nível de formação dos progenitores e o grau de controlo metabólico apresentado pelos seus filhos diabéticos tipo I, constatando-se a tendência para, nos casos em que pelo menos um dos pais apresentava maior diferenciação nas suas habilitações literárias, os valores percentuais médios de HbA_{1c} serem mais favoráveis, retratando um melhor controlo da doença. Curiosamente, de forma análoga, o nível de instrução dos pais é referenciado em alguns estudos como influente na incidência de cárie dentária; globalmente, quanto mais elevado for o nível de instrução, mais positivos parecem ser os comportamentos da criança relacionados com a saúde oral e, de forma particular, no que respeita aos fatores etiológicos na base da cárie dentária ^{372, 1101-1103}.

Em termos comportamentais uma outra variante muito importante assenta no tipo de dieta preconizado na DM tipo I, que se tem tomado muito menos restritivo e progressivamente mais flexível no que respeita ao conteúdo devido sobretudo aos regimes insulínicos contemporâneos ¹¹⁰⁴⁻¹¹⁰⁸. Não obstante verifica-se que mesmo a base das “boas práticas” alimentares preconizadas transversalmente nem sempre são cumpridas por estas crianças, com erros alimentares repetidamente cometidos que poderão traduzir-se em complicações a médio/longo termo ¹¹⁰⁴. Um dos exemplos prende-se com o consumo de hidratos de carbono refinados que, à luz da atual gestão dietética da DM, não é tão limitado quanto se poderia pensar (desde que devidamente balizados os valores da glicemia a respeitar); por outro lado, o consumo de alimentos “processados” poderá ser mais atrativo nestas crianças pela facilidade na contabilização dos hidratos de carbono ¹¹⁰⁴. Pelo exposto toma-se fácil perceber a necessidade, tantas vezes sublinhada, de promover estratégias e abordagens alternativas na génese da educação alimentar com adaptações às exigências e condicionantes da doença ^{1109, 1110, 1111}. Na atualidade

é inclusivamente preconizado que possa ser adotado um plano alimentar com base nas preferências individuais, mas também particularidades étnicas, familiares, culturais, padrões de atividade física e, obviamente, requisitos nutricionais ^{1105, 1112, 1113}. Na avaliação da frequência de consumo de hidratos de carbono nos três subgrupos deste estudo constatou-se que as crianças diabéticas (independentemente do seu grau de controlo metabólico) apresentaram um consumo menos frequente de guloseimas (Chi-quadrado, $p=0,001$).

Tendo em conta que o perfil dietético influencia largamente a ocorrência de patologia oral revelou-se importante a caracterização dos subgrupos da amostra tendo por base o número de refeições diariamente cumpridas verificando-se a ocorrência de correlações estatisticamente significativas (Chi-quadrado, $p<0,0001$) entre este parâmetro e a presença de DM, tendencialmente no sentido de serem as crianças diabéticas quem cumpria um maior número de refeições diárias (>5); o grau de controlo metabólico não se afigurou, *per se*, estar relacionado com esta variável. Siudikiene *et al.*, 2005 mencionam, de acordo com os resultados obtidos no seu estudo, que as crianças diabéticas tendem a realizar um maior número de refeições principais e um menor número de *snacks* (lanches “intermédios”) do que as não diabéticas, ainda que sem qualquer relação com o controlo metabólico da doença ⁶³⁶.

Outros hábitos descritos neste estudo foram os respeitantes à higiene oral, responsáveis diretos na ocorrência e gravidade de patologia oral; ao ser estabelecido um paralelo entre grupos concluiu-se, da análise descritiva, que as crianças efetuavam, na sua maioria, apenas uma escovagem dentária diária (56,9% dos não diabéticos e 43,6% dos diabéticos), não sendo muito distinta a percentagem, no caso dos diabéticos, dos que escovavam os seus dentes em dois períodos do dia (39,1%). Pela análise dos dados disponibilizados pela DGS em 2008 na sequência da realização do “II Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais” na população infanto-juvenil portuguesa, a higiene oral, avaliada através da questão relativa à realização da escovagem dos dentes duas vezes/dia com uma pasta dentífrica fluoretada, esta era executada por 50%, 67% e 69% das crianças e adolescentes de 6, 12 e 15 anos, respectivamente, resultados aparentemente um pouco melhores do que os obtidos no presente estudo ¹⁰⁷⁴. Algo inesperado, mas não muito diferente do que relata a literatura, foi o facto de cerca de 10% das crianças diabéticas e 4% das não diabéticas não terem por hábito a escovagem dentária diária, apesar da massificação da venda e utilização de dentífricos e o acesso a informação permanentemente disponibilizada relativamente aos benefícios das boas práticas de higiene oral. Com alguma surpresa verificou-se uma associação estatisticamente significativa (Chi-quadrado, $p=0,012$) entre a frequência de escovagem dentária e o controlo metabólico da doença (em causa apenas as crianças diabéticas), com as crianças com melhor controlo metabólico a cumprirem um menor número de escovagens dentárias diárias. A referência à utilização do fio dentário não foi, pelo contrário, surpreendente: apenas cerca de 10% dos saudáveis e 13% dos diabéticos o utilizam regularmente, percentagens não muito diferentes das descritas para a população infanto-juvenil portuguesa, em que a utilização diária do fio dentário foi referida por 14% e 10% dos jovens de 12 e 15 anos, respetivamente, ainda que com variações regionais significativas ¹⁰⁷⁴. Já Alves *et al.*, 2009, numa amostra constituída por 55 crianças com DM tipo I e igual número de controlos saudáveis, obtiveram resultados mais favoráveis uma vez que a maioria das crianças (diabéticas e não diabéticas) escovavam os dentes 3x/dia e o uso diário de fio dentário mais abrangente (cerca de 30% dos diabéticos e 18% dos controlos) ¹¹¹⁴. Ainda a este mesmo propósito Siudikiene *et al.* em 2005 referem, num estudo com 70 crianças diabéticas tipo I de 10 a 15 anos de idade e respetivo

grupo controlo, não existirem diferenças estatisticamente significativas na frequência de escovagem entre grupos (diabéticos/saudáveis e diabéticos controlados/não controlados); no entanto, a utilização do fio dentário como meio complementar de higiene oral foi relatada como menos frequente no grupo dos diabéticos⁶³⁶.

O estudo da função salivar nos diabéticos tem-se essencialmente baseado na avaliação de características bioquímicas e medição dos fluxos (estimulado e não estimulado), relacionando-os com particularidades inerentes à própria DM⁹⁵⁹. Em relação especificamente ao fluxo os estudos referem, ou uma diminuição do mesmo, ou uma ausência de variação comparativamente a indivíduos saudáveis^{355, 358, 400, 554, 555, 560-562, 593, 940, 944, 946, 948, 958, 959, 966, 981, 1017, 1115, 1116}. Esta alteração, a acontecer, poderá estar relacionada com a infiltração adiposa celular das glândulas salivares, alterações celulares mucosas subsequentes a desidratação resultante de poliúria ou perturbações microvasculares, inflamação local, complicações infecciosas, neuropatia, alterações metabólicas ou eventuais esquemas terapêuticos^{355, 360, 560, 940, 948, 959, 1115, 1116}. A divergência entre os resultados dos estudos de avaliação do fluxo salivar total em pacientes diabéticos pode ainda ser explicada por fatores tão diversos quanto a toma (ou não) do pequeno almoço, o período do dia em que é efetuada a colheita, por diferenças nos métodos empregues, variação de idade, género e diferentes níveis de controlo metabólico^{941, 1117-1120 cit in 854}. Paralelamente, o processo de crescimento e maturação das glândulas salivares, à semelhança do que acontece transversalmente com todas as estruturas anatómicas de crianças e adolescentes, pode também refletir-se na composição da saliva, tal como a maturação hormonal, emocional, do próprio sistema imunitário e alterações nos padrões nutricionais¹¹²¹.

No que concerne à influência propriamente dita do controlo metabólico e duração da DM no fluxo salivar, apesar de uma grande parte dos autores aludir a uma tendencial descida no fluxo salivar de diabéticos com mau controlo glicémico, nem sempre esta ocorrência é verificada^{355, 555, 946, 948, 950, 1122, 1123}. O mesmo se constatou no presente estudo, em que a grande maioria das crianças, diabéticas ou não diabéticas, apresentaram uma taxa de secreção ≥ 1 mL/min, considerada dentro dos parâmetros normais; foi, no entanto, no subgrupo de diabéticos não controlados metabolicamente que se verificou uma maior percentagem (19,3%) de crianças com fluxo salivar baixo (< 1 mL/min). Não foram, porém, observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) genericamente entre o grupo de diabéticos e não diabéticos ($p = 0,539$) ou na relação com o controlo metabólico da DM ($p = 0,772$).

Noutra vertente mantém-se controverso o potencial da saliva no auxílio à monitorização da DM¹¹²⁴. Parâmetros salivares padronizáveis tais como a glicose, proteínas totais e amilase são apontados como possíveis indicadores e, de entre estes, a glicose tem sido a mais profusamente investigada. Num estudo de 2010 efectuado por Panchbhai *et al.*, os níveis médios de glicose salivar eram claramente mais elevados nos diabéticos quando comparados com os não diabéticos (controlos saudáveis)⁹⁵⁹. No entanto, estes resultados diziam respeito a uma população adulta, cujas características anatómicas e fisiológicas divergem obviamente das inerentes às crianças, ainda que a referida mensuração dos níveis de glicose salivar revele alguma concordância com o referenciado noutras publicações^{541, 558, 560, 562, 669, 690, 774, 794, 944, 955, 962}. Outros autores demonstraram que os níveis de glicose não apresentavam quaisquer flutuações se comparados diabéticos e saudáveis, ou apenas se encontravam alterados na saliva segregada pelas glândulas parótidas^{561, 940, 1125}.

Os níveis médios, considerados normais, de glicose salivar rondam os 0,5-1mg/100 mL não condicionando, em situações não patológicas, a ocorrência acrescida de alterações do meio oral; sabe-se, no entanto, que níveis mais elevados podem favorecer a proliferação e adesão de microrganismos, suprimindo em paralelo algumas das funções imunitárias a cargo dos neutrófilos acentuando a susceptibilidade à adesão^{774, 824, 1036}. A elevação dos níveis de glicose na saliva pode ir de encontro aos efeitos da membranopatia diabética, que conduz a um aumento de percolação da glicose do sangue para a saliva, alterando a composição salivar na DM^{552, 554, 824, 959, 1035}. Na presente investigação, através dos métodos analíticos empregues para quantificar os metabolitos salivares, não foram detetados níveis significativos de glicose, comparativamente a outro tipo de moléculas passíveis de monitorização. Com este facto apenas pode ser afirmado que, nas amostras colhidas, os níveis de glicose se encontravam num limiar abaixo do detetável por ¹H-NMR; por outro lado, assumindo-se que a medição da glicose nos biofluidos constitui um procedimento altamente sensível em termos práticos é possível que, apesar dos cuidados tidos na preservação e tratamento analítico das amostras, estes não tenham sido suficientes para evitar a acelerada metabolização pelos microrganismos presentes. É de sublinhar que uma grande parte dos microrganismos salivares fazem uma utilização extremamente rápida da glicose, cujos níveis decrescem instantaneamente mesmo quando a saliva é mantida à temperatura preconizada após a colheita, tomando-se necessário recorrer a técnicas complementares para que seja possível proceder à sua quantificação¹¹²⁶.

Por forma a uniformizar as colheitas de saliva e minimizar a influência de outros fatores interferentes (ritmo circadiano, por exemplo) tentou-se, no decorrer deste estudo, que as mesmas fossem efectuadas em alturas do dia similares, maioritariamente pela manhã, sem que tivesse existido ingestão de alimentos no período de tempo previamente definido (ver II, 2.1.1). Obviamente tratando-se de uma população constituída por crianças, e sendo a maior parte das mesmas diabéticas tipo I, há que ponderar a hipótese de nem todas terem cumprido estritamente estes requisitos (ainda que o tenham afirmado) uma vez que a questão do controlo da glicemia poder-se-á ter pontualmente sobreposto às restrições temporárias “impostas”. A mesma reflexão pode ser aplicada à existência (ou não) de escovagem dentária prévia à colheita, influenciando hipoteticamente alguns dos resultados expostos neste estudo, particularmente em relação à caracterização microbiológica e dos metabolitos salivares. Efetivamente, qualquer estudo clínico apresenta “limitações” que são transversais aos estudos em humanos, neste caso particular agravado por se tratarem de crianças portadoras de uma doença crónica que implica uma série de cuidados diários influentes no seu grau de controlo e minimização de complicações. Por outro lado, estas crianças parecem tender a ser alvo de hiperprotecção e, de alguma forma, paralela e tendencialmente “compensadas” ou “desculpadas” em termos comportamentais^{567, 569}. Não obstante, é muitas vezes verificada, independentemente de se tratar de crianças saudáveis ou com patologia associada, alguma dificuldade em termos de decisão clínica no diagnóstico da disfunção glandular salivar (hipofunção, mais frequentemente), com eventual necessidade de avaliação complementar, na qual pode ser incluída a observação da secra labial, da mucosa oral ou, inclusive, a avaliação do risco de cárie dentária¹¹²⁷.

No relacionado com as variações técnicas na estimulação e colheita das amostras salivares, estas podem causar diferenças, quer em termos de resposta imunitária, quer na própria função glandular, culminando em alterações na concentração de diferentes elementos^{1128, 1129}. Em 1995 Dasanayake *et al.*

referem, por exemplo, diferenças em relação à concentração de *S. mutans* tratando-se de saliva estimulada ou não estimulada ¹¹³⁰. Assim, a seleção do método de colheita de saliva deve obedecer a critérios, não apenas baseados em considerações científicas, mas também de ordem prática ¹¹³¹. As técnicas mais comumente empregues em estudos do foro microbiológico salivar baseiam-se numa colheita após estimulação, acarretando dificuldades adicionais no caso de crianças pequenas, nem sempre cooperantes ¹¹³². Este facto veio a comprovar-se neste estudo, embora apenas duas crianças (uma de cada grupo diabéticos/não diabéticos) se tenham recusado ou demonstrado incapacidade para colaborar. De acordo com algumas referências, a análise após colheita sem estimulação dos fluidos orais espelha com maior fiabilidade os diferentes estados fisiológicos individuais ^{1128, 1129}. Acresce que a colheita salivar pela técnica de “cuspir” pode conter uma quantidade significativamente maior de bactérias quando em comparação com outras técnicas (*drooling* ou “babar”, por exemplo), diferenças mais significativas para curtos períodos de colheita, implicando alguns condicionalismos no armazenamento/preservação para posterior análise ⁸³³. Estas diferenças de procedimentos poderão constituir outro dos fatores explicativos da variabilidade de resultados encontrada por distintos investigadores na quantificação bacteriana salivar, acentuando a necessidade de uniformização técnica, conforme abordado detalhadamente mais adiante ^{854, 1117, 1133, 1134}. Um outro parâmetro a considerar prende-se com o potencial decréscimo microbiano (temporário) verificado após o bochecho com água previamente à colheita, assumindo-se que grande parte das bactérias salivares não sejam originárias da placa bacteriana, estando antes em “circulação/trânsito” ^{854, 1135-1137}. As concentrações bacterianas salivares podem ainda alterar-se com o tempo de mastigação do estimulante, devendo o mesmo estar devidamente uniformizado ¹¹¹⁷. Ambas as condicionantes, bochecho prévio e mastigação do estimulante, foram cumpridas no protocolo instituído para o presente trabalho (ver II, 2.4.1).

Quanto à composição e funções salivares, apenas foram avaliados no presente estudo a capacidade tampão e os perfis metabólico e inflamatórios (parciais, neste último caso). A este propósito, os resultados da literatura são igualmente contraditórios e relativamente inconsistentes, tendo por base variações ou condicionantes genericamente dependentes da duração e controlo da DM, a par da amplitude nas faixas etárias e género dos indivíduos avaliados ^{355, 562, 774, 944, 959, 966}. A pertinência da monitorização do pH e capacidade tampão salivares dos diabéticos assenta na influência que potencialmente exercem na etiopatogénese de diferentes patologias orais, com especial relevo para a cárie dentária ^{427, 547, 554, 942}. Kjellman, numa publicação datada dos anos 70, fez menção a uma maior capacidade tampão observada nos diabéticos comparativamente a não diabéticos, sugerindo que esta diferença estaria relacionada com o tipo de dieta cumprida pelos primeiros ^{1138 cit in 944}. No entanto, Aren *et al.* em 2003, num estudo envolvendo 32 crianças diabéticas com diferentes períodos de duração da doença e um grupo controlo puderam constatar diferenças no respeitante à capacidade tampão e pH salivar, mas não em relação ao fluxo; os autores referem que as diferenças de menor pH e capacidade tampão no grupo de crianças diabéticas poderiam ser inerentes à maior concentração de glicose salivar e consequente produção metabólica de ácido láctico pela placa bacteriana, condicionando a suscetibilidade para patologia periodontal e cárie dentária ⁶²⁰.

Os hidratos de carbono residuais e a capacidade tampão da saliva afetam o pH da placa (6,0-7,3, 2h - 2h e 30 min após a ingestão da última fonte exógena de hidratos de carbono), a menos que o mesmo seja tão baixo que condicione as funções enzimáticas. O pH aumenta durante os primeiros 5 min

após a ingestão da maior parte dos alimentos, para imediatamente baixar para 6,1 (ou ainda mais baixo) cerca de 15 min depois; a não ser que haja uma nova ingestão de hidratos de carbono fermentáveis o pH da placa volta gradualmente a recuperar os seus valores de base ou residuais. Desta forma, torna-se simples perceber a dinâmica concertada com influência no pH intraoral e que envolve a ingestão alimentar, fluxo, capacidade tampão e depuração salivares^{856, 865} cit in⁸²⁹. Na presente investigação, para além da medição do fluxo, foi avaliada a capacidade tampão salivar sem que, no entanto, tivesse sido especificamente determinado o valor exato de pH atendendo ao tipo de testes empregues (ver II, 2.4.2): apesar da maior parte das crianças apresentar uma elevada capacidade tampão (59,7% dos não diabéticos vs 72,2% dos diabéticos) não puderam ser, no entanto, observadas associações estatisticamente significativas entre esta variável e a presença de DM, ou mesmo na relação com o controlo metabólico da doença, conforme reportado anteriormente por outros autores^{553, 555, 560, 561}.

A saliva contém muitos componentes que, mais ou menos acentuadamente, interagem com os diversos microrganismos, condicionando a composição da microflora oral. Um decréscimo na taxa de salivacção e, eventualmente do pH, nos diabéticos poderá promover a ação dos microrganismos cariogénicos (referência particular para os *S. mutans*, *Lactobacillus* e *Candida spp.*), consequência igualmente atribuída a uma limitação na remoção ou desorganização mecânica dos mesmos nas superfícies dentárias^{562, 838}. Contudo, os microrganismos com capacidade cariogénica não determinam, de forma exclusiva, o surgimento das lesões de cárie dentária; a disponibilidade de substrato e as condições fisiológicas do hospedeiro são outros dos fatores determinantes. Está, porém, perfeitamente estabelecido que a atividade de cárie lhes é inerente pela complexa e sinérgica inter-relação placa bacteriana/saliva, bem como a associação a alterações de pH, com desmineralização e perda estrutural¹¹³⁹. Neste contexto, a avaliação microbiológica representa uma ferramenta útil para monitorização do risco de cárie, inclusivamente nos pacientes diabéticos, ainda que a etiologia multifatorial em causa “obrigue” a uma combinação de mecanismos de diagnóstico. Dado que estes agentes se caracterizam por propriedades acidogénicas e acidófilas, é importante avaliar a presença de ambos, sendo discutível qual o tipo de contabilização microbiológica mais importante, se a da placa, se a da saliva¹¹⁴⁰.

Os testes salivares de diagnóstico para avaliação do risco de cárie com propósito preditivo têm sido usados há já algumas décadas, inicialmente para o género *Lactobacillus*, seguindo-se-lhes o *Streptococcus* e *Candida*^{410, 1141-1145} cit in¹¹³². A presença na saliva de *Lactobacillus*, considerados “colonizadores secundários” no processo de cárie dentária (em contraste com os *S. mutans*, com um papel decisivo na fase inicial) e de diferentes espécies de *Candida*, pode resultar (e também contribuir) para as circunstâncias acidúricas que normalmente culminam no aparecimento de lesões; é, por esta mesma razão, que os testes que os quantificam poderão constituir uma hipótese válida na caracterização da atividade cariogénica, apesar do valor preditivo a longo prazo carecer de evidência científica mais efetiva^{1132, 1146}.

Karjalainen *et al.*, 1996 determinaram que, especificamente em relação aos *Lactobacillus* salivares e leveduras, a concentração dos mesmos poderá acentuar-se em virtude de um decréscimo do fluxo e aumento dos níveis de glicose salivares, bem como de valores elevados de HbA_{1c}⁹⁵⁵. Também o tempo de duração da DM poderá influenciar o padrão de colonização oral dos diabéticos, mantendo-se relativamente estável a concentração de *S. mutans*, enquanto a de *Lactobacillus* tende a sofrer flutuações mais acentuadas, questionando-se a relação com o já referido conteúdo de glicose salivar⁵⁵⁸. Twetman *et*

al. em 1989 e 2002, após análise comparativa da distribuição quantitativa destas duas espécies em dois grupos distintos de crianças (diabéticas e saudáveis) concluíram apenas existirem diferenças significativas relativamente aos *Lactobacillus* (menor concentração nos diabéticos), apontando como possível explicação o regime dietético das crianças diabéticas^{537, 552}. Por outro lado, Thorstensson *et al.* em 1989, indicando esta mesma causa, não puderam verificar quaisquer diferenças entre grupos no que respeita à carga bacteriana, à semelhança do descrito por Edblad *et al.*, 2001^{553, 944, 1044}. Paralelamente, também no presente estudo não foi encontrada uma relação relevante em termos estatísticos (Chi-quadrado, $p=0,749$) quando feita a correlação entre a frequência de ingestão alimentar e a carga bacteriana salivar; observou-se, no entanto, que crianças com maior frequência de consumo de guloseimas apresentaram maior carga bacteriana (Chi-quadrado, $p=0,026$). Swanljung *et al.*, 1992 descreveram uma maior frequência na contagem salivar, quer de *S. mutans*, quer de *Lactobacillus* em adolescentes diabéticos, ainda que sem significância estatística⁵⁴⁷. Siudikiene *et al.* 2006 detetaram diferenças na concentração salivar de *S. mutans* entre diabéticos metabolicamente controlados e não controlados, menor nos controlados⁵⁵⁵. Syrjala *et al.* em 2003 concluem ainda que o mau controlo metabólico da DM reforça a associação positiva entre a concentração salivar de *S. mutans* e *Lactobacillus* e o desenvolvimento de lesões de cárie dentária⁵⁵¹. Contrariamente, Canepari *et al.*, 1994 referem que, independentemente de se tratarem de crianças diabéticas controladas, não controladas ou saudáveis, o aumento da concentração salivar de *S. mutans* é notório nas que apresentam lesões ativas de cárie, sem qualquer relação particular com a DM⁵⁶¹. Na análise comparativa com resultados do presente estudo foi possível reafirmar ou contrariar algumas destas associações, nomeadamente no referente à associação entre a carga bacteriana salivar e ser não diabético ou diabético controlado (Chi-quadrado, $p=0,019$), em que as crianças diabéticas controladas parecem apresentar uma carga bacteriana menor do que as não diabéticas; não se registaram, no entanto, eventuais diferenças tendo por base a variável “controlo metabólico” (Mann-Whitney, $p=0,074$), ou mesmo, de uma forma geral, entre diabéticos e não diabéticos (Chi-quadrado, $p=0,144$ /Mann-Whitney, $p=0,680$). Já entre a carga bacteriana e a capacidade tampão salivar a associação constatada variou no sentido dos pacientes cuja saliva apresentava maior capacidade tampão manifestarem menor carga bacteriana (Chi-quadrado, $p<0,0001$), facto já extensamente corroborado, residindo a explicação básica nos mecanismos inerentes ao metabolismo bacteriano. Contrariamente, o fluxo salivar estimulado não se revelou fundamental na carga bacteriana salivar (Chi-quadrado, $p=0,091$).

Em conformidade, foi possível estabelecer uma relação estatística altamente significativa entre a carga bacteriana salivar patente, quer nas crianças diabéticas, quer nas não diabéticas, e os índices de cárie calculados para ambas as dentições ($p<0,0001$). Os valores mais elevados (>4) verificaram-se nas crianças com concentrações de *S. mutans* e *Lactobacillus* $\geq 10^5$ UFC/mL saliva, revelando-se igualmente influente, numa relação inversa, a frequência de escovagem dentária na carga bacteriana salivar ($p=0,012$). Twetman *et al.*, 2002, numa tentativa de determinar quais os fatores de maior influência para o desenvolvimento de lesões de cárie numa amostra de crianças e adolescentes com DM tipo I sublinharam estas mesmas conclusões: durante o período de tempo considerado (três anos), os parâmetros identificados relacionavam-se com uma deficiente higiene oral, experiência passada de cárie, elevados níveis bacterianos salivares (*Lactobacillus*), a par do já referido grau de controlo metabólico⁵⁵².

Também o género aparentou, a avaliar pela amostra englobada neste trabalho, constituir um factor de relevância, uma vez que pode ser reconhecida uma associação estatisticamente significativa

(Chi-quadrado, $p=0,029$) entre a carga bacteriana e o género, associação no sentido dos pacientes do género masculino apresentarem maior carga bacteriana salivar. Na literatura este tipo de associação não está claramente descrita referenciando-se, todavia, que as raparigas tendem a ser “mais preocupadas” com aspetos relacionadas com a saúde oral do que os rapazes (cuidados alimentares e higiénicos, por exemplo) ^{1101, 1147-1149}.

Nenhum dos metabolitos ou mesmo marcadores imunoinflamatórios avaliados se revelou estatisticamente significativo na associação com a carga bacteriana salivar, à exceção do lactato (Mann-Whitney, $p=0,019$), produto terminal do metabolismo anaeróbio da glicose resultante da redução enzimática (LDH) do ácido pirúvico nos processos de fermentação também na cavidade oral (ação particular dos *Lactobacillus*): as crianças com maior carga bacteriana salivar de *S. mutans* e *Lactobacillus* apresentaram menores concentrações salivares de lactato, facto provavelmente associado à competição entre as múltiplas espécies presentes.

A prevalência e gravidade da cárie dentária têm vindo tendencialmente a diminuir na grande maioria das populações de diferentes regiões do planeta, tendo contribuído para esta ocorrência fatores decisivamente correlacionados com a utilização preventiva generalizada de fluoretos, uma abordagem diagnóstica e intervenção terapêutica cada vez mais precoces ¹³⁰. Publicações recentes listam algumas das inúmeras conotações associadas ao termo “cáries”, tais como “doença infecciosa”, “cavidade/cavitação”, “desmineralização”, “lesão de mancha branca/castanha”, “lesão radiográfica/histológica”, “dentina infetada”, “pigmentação”, e tantas outras incluindo “dissolução química dos tecidos duros dentários”, “cárie ativa/inativa/estacionária” ^{392, 472, 1150-1155}. Estas dissonâncias ou diferenças de entendimento e percepção da doença cárie dentária não favorecem a clarificação exigida nos referidos processos de diagnóstico e tomada de decisão clínica; porém, os avanços de conhecimento e técnica têm possibilitado um estudo mais detalhado desta patologia contemplando a adopção gradual de contributos de diferentes áreas nas quais se incluem, a título exemplificativo, a Microbiologia, a Química e a Imagiologia ⁴⁷². Tende, de certo modo, a contrariar-se a teoria essencialista que assenta na dicotomia tácita que a cárie existe/não existe, independentemente da definição de critérios; porém, outros autores fazem questão de reafirmar que o diagnóstico é definido como uma determinação da doença mas não como uma determinação dos seus sinais/sintomas ^{472, 1156}.

De acordo com a OMS o diagnóstico e registo de cárie dentária em levantamentos epidemiológicos têm sido preconizados (e levados a cabo) em estados de cavitação por observação clínica “direta” atendendo, essencialmente, às dificuldades inerentes à detecção de lesões em estádios mais precoces (sem exposição de tecido dentinário) ^{1076, 1077}. Não obstante, a inclusão destas lesões não cavitadas assume particular relevância em populações com baixa prevalência e progressão lenta da doença, uma vez que poderão ser desejavelmente alvo preferencial de medidas preventivas, minimizando a necessidade de aplicação de outro tipo de procedimentos mais invasivos ^{130, 489, 490}.

Os resultados relatados na literatura referentes à prevalência de cárie em diabéticos são muitos díspares e, perante a possibilidade de aumentar a sensibilidade, especificidade e fiabilidade de diagnóstico optou-se, neste estudo, por utilizar alternativamente os critérios do ICDAS-II baseados na inspeção visual ⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁹. Ainda que este tipo de registo diagnóstico não tenha vindo a ser sistematicamente empregue pelas dificuldades e complexidade inerentes, neste estudo (e noutras referências consultadas), a concordância intraexaminador obtida apresentou um valor que pode ser considerado elevado, favorecendo a

consistência dos resultados^{471, 1157}. Uma vez que os dados de referência para comparação de índices de cárie (CPO e cpo - OMS) se baseiam em registos de lesões cavitadas (o que constitui uma reconhecida limitação) foi considerado em termos de cálculo, também neste estudo, e à semelhança do descrito na literatura, os estádios a partir de D3 preconizados originalmente pela OMS em 1971 correspondentes a lesões em dentina, tornando comparáveis os registos^{471, 483, 484, 490, 1076, 1158}. Obviamente que se consideradas todas as lesões passíveis de codificação pelo ICDAS-II- se tornaria expectável um aumento do registo das mesmas quando em comparação com os critérios historicamente adoptados pela OMS^{483, 484}. De entre as crianças com evidência de cárie dentária, a percentagem com lesões não cavitadas (atendendo aos critérios do ICDAS II) não foi muito díspar entre grupos e mesmo entre dentições temporária/permanente (respetivamente não diabéticos 9%/13% e diabéticos 12%/8%). Todas estas questões, referentes não apenas ao registo e análise do grau de desmineralização e à presença de cavitação, mas também à atividade da doença, merecem ser desenvolvidas mais pormenorizadamente pela importância que as reveste, não tendo sido objetivo particular deste estudo pela extensão e complexidade da multiplicidade dos dados em avaliação.

Especificamente em relação à DM, para além da enorme variação de valores descritos para a prevalência de cárie dentária, também a extrapolação para a DM tipo I dos dados relativos à DM tipo 2 (a que se referem a maioria das publicações) não será adequada^{358, 536, 555, 557, 559, 561, 981, 1055, 1059}. Ainda que possa ser referenciado um acréscimo na prevalência de cárie devido, hipoteticamente, a um aumento na concentração de glicose salivar, alterações de pH, viscosidade salivar, diminuição do fluxo e disfunção glandular salivar, está também, e contrariamente, descrita uma possível redução na ocorrência da mesma atribuída ao (questionado) decréscimo na ingestão de sacarose^{554, 1159}. No presente trabalho, a avaliação do factor “frequência de consumo de gloseimas” (uma das alternativas de aferição de ingestão de sacarose) não revelou, no entanto, qualquer significância estatística na relação com os índices CPO (Chi-quadrado, $p=0,470$) e cpo (Chi-quadrado, $p=0,182$). Está ainda descrito que, após o diagnóstico da DM poderá, porventura, assistir-se a um aumento da atividade de cárie em algumas das crianças diabéticas (quando comparadas com não diabéticas); esta variação parece tender a normalizar gradualmente com a disciplina dos hábitos dietéticos e o cumprimento da terapêutica insulínica⁶⁸⁹. Outros autores relacionam, inclusivamente, a idade de diagnóstico/manifestação e a duração da DM com a incidência de lesões de cárie ou o seu tratamento, a par dos efeitos na microflora oral e alterações de composição e/ou fluxo salivar, já referenciadas^{533, 555, 557, 558, 560}. Miko *et al.*, 2010 referiram que a manifestação precoce da DM pode assumir alguma influência na prevenção da cárie dentária, ainda que na dependência direta dos cuidados de saúde oral e controlo metabólico adequado⁵⁵⁷. Contudo, na presente investigação a avaliação da relação do parâmetro “anos decorridos desde o diagnóstico da DM” com ambos os índices, CPO e cpo, não se mostrou significativa (Chi-quadrado, $p=0,610$; teste exato de Fisher, $p=0,484$, respetivamente).

Pelo que foi possível constatar da revisão de literatura não existe nenhum estudo publicado em Portugal, até à data, que caracterize de forma concreta as crianças diabéticas tipo I relativamente à prevalência de cárie dentária, sendo este o primeiro a descrevê-la com mais pormenor. Nos dados relativos ao último “Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais”, a ausência de doença em ambas as dentições foi contabilizada através da percentagem de crianças livres de cárie; concluiu-se que a percentagem de crianças portuguesas livres de cárie em ambas as dentições era de 51%, 44% e 28% aos

6, 12 e 15 anos, respetivamente ¹⁰⁷⁴. De salientar que a meta estabelecida pela OMS em 1999 previa que no ano 2020 a percentagem de crianças livres de cárie aos 6 anos deveria ser de 80% para o continente europeu ¹¹⁶⁰. Também na presente investigação, a experiência de cárie foi tida em consideração de forma global e/ou fracionada pelos três subgrupos clínicos: apenas 12,5% dos não diabéticos e 23,3% dos diabéticos não apresentaram experiência de cárie em qualquer das dentições. 40,3% dos não diabéticos e 13,5% dos diabéticos revelaram experiência de cárie em ambas as dentições. Aos 6 anos, 100% das crianças incluídas (diabéticas ou não diabéticas) tinham os seus dentes permanentes integralmente sãos, embora em apenas cerca de 15,3% se tenha verificado o mesmo em relação aos dentes temporários; de referir que unicamente 20,0% da totalidade das crianças de 6 anos (em fase mista da dentição) apresentavam em simultâneo índices cpo e CPO=0,0. Já quando consideradas as crianças de 12 e 15 anos, apenas 16,7% e 14,8% (respetivamente) não apresentavam qualquer evidência de lesão de cárie (tratada ou não tratada) na dentição permanente. Desta forma, a avaliar pelos dados descritivos, apenas no grupo dos 6 anos e especificamente em relação ao CPO (invariavelmente =0,0) foram obtidos resultados mais acentuadamente favoráveis, denotando os restantes um agravamento relativamente aos obtidos para a população infanto-juvenil portuguesa no geral.

De acordo com a classificação da OMS, que utiliza como referencial os níveis de cárie dentária aos 12 anos (assumindo os valores do índice CPO), Portugal situa-se entre os países de baixa prevalência da doença, tendo inclusivamente atingido os valores preconizados para a região europeia para o ano de 2020 (1,50) ¹⁰⁷⁴, ¹¹⁶⁰. Reportando uma vez mais aos dados do “II Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais” os valores calculados para os índices cpo/CPO aos 6 anos eram de 2,10/0,07 respetivamente; aos 12 e 15 anos, o índice de CPO 1,48 e 3,04, com diferenças regionais estatisticamente significativas em todos os grupos etários ¹⁰⁷⁴. Os valores calculados para a amostra do presente trabalho foram, no entanto, também aqui algo diferentes destes. Assim, de forma descritiva e relativamente ao índice cpo, o valor obtido na amostra total (diabéticas e não diabéticas) foi de $2,70 \pm 2,42$, de $3,52 \pm 2,53$ para as crianças não diabéticas, $1,79 \pm 1,90$ para a totalidade das crianças diabéticas, $2,29 \pm 2,61$ e $1,47 \pm 1,57$ para as crianças diabéticas com bom e mau controlo metabólico, respetivamente. Já em relação ao índice CPO, a totalidade da amostra obteve o valor de $1,54 \pm 1,99$, ao passo que considerando apenas as não diabéticas o valor aumentou para $1,91 \pm 2,23$; com o mesmo cálculo obteve-se no grupo dos diabéticos $1,25 \pm 1,70$, mais especificamente nos metabolicamente controlados $1,14 \pm 1,49$ e nos não controlados $1,31 \pm 1,84$. No cálculo por idades-índice obteve-se, respetivamente, aos 6 anos um valor de CPO de 0,0 (independentemente da condição clínica), que aumentou aos 12 anos para $4,20 \pm 1,92$ na totalidade da amostra, $6,00 \pm 1,41$ no caso as crianças não diabéticas, $3,00 \pm 1,00$ para o conjunto das diabéticas, $1,67 \pm 1,37$ nas com adequado controlo glicémico e $2,75 \pm 2,14$ nas menos controladas metabolicamente. Nos adolescentes de 15 anos estes valores foram, pela mesma ordem: $4,00 \pm 1,00$ (amostra total), $5,00 \pm 4,00$ (não diabéticas), $5,74 \pm 4,48$ (diabéticas), $2,25 \pm 2,87$ (adequado controlo metabólico da DM) e $6,67 \pm 4,44$ (controlo glicémico inadequado). Pode afirmar-se, genericamente e em termos descritivos, que a quase totalidade dos valores de CPO da amostra, independentemente da presença ou ausência de doença, tenderam a ser mais elevados do que os descritos para a população infanto-juvenil portuguesa em geral, à exceção das crianças de 6 anos (todas com CPO=0,00) e do grupo de diabéticos de 15 anos (CPO= $2,25 \pm 2,87$ vs 3,04). Constata-se uma acentuação da doença no grupo dos não diabéticos saudáveis, sobretudo nas crianças de 12 anos

($6,00 \pm 1,41$) sendo, neste mesmo grupo etário, as crianças diabéticas com adequado controlo metabólico as que apresentam os valores mais baixos ($1,67 \pm 1,37$), ainda assim mais elevados do que os referidos pela DGS - 1,48. No respeitante à dentição temporária, os valores de cpo aos 6 anos foram aqui mais acentuados na amostra total, observando-se uma particular acentuação nas crianças não diabéticas (contrariamente às diabéticas).

Na investigação de Miko *et al.*, 2010, também conduzida em adolescentes diabéticos tipo I mas dos 14-19 anos foi descrito que todos já apresentavam experiência de cárie e, quando em comparação com não diabéticos saudáveis do mesmo intervalo etário, apresentavam também valores médios mais elevados de índice CPO (embora menos dentes cariados e mais restaurados); o menor número de dentes cariados foi, em média, apresentado pelos adolescentes diabéticos bem controlados⁵⁵⁷.

Conforme já referido, não é consensual que o controlo metabólico ou as eventuais diferenças nas características da dieta tendam a promover ou, pelo contrário, diminuir o desenvolvimento das lesões, identificando-se a higiene oral como principal factor influente^{427, 547, 551-554, 557, 558, 561, 566}. Saes Busato *et al.* em 2010 afirmaram a existência de um pior estado de saúde oral num grupo de adolescentes diabéticos tipo I (relativamente a não diabéticos), ainda que sem qualquer influência do controlo metabólico⁵⁵⁶. Já Miralles *et al.*, 2006 identificaram, não apenas o controlo metabólico da doença, mas também a duração da mesma ou a existência de complicações enquanto determinantes na incidência de cárie dentária³⁵⁸. Karjalainen *et al.*, 1997 descreveram uma associação entre a experiência de cárie e um inadequado controlo metabólico em crianças com diagnóstico da DM em idades inferiores a 7 anos⁴²⁷. Na amostra que compôs o presente estudo verificou-se uma diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p=0,002$) quando correlacionado o índice CPO e o controlo metabólico da DM, pertencendo ao grupo de melhor controlo as crianças com índice $CPO \leq 4$. No entanto, o mesmo não se verificou entre o índice CPO e a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,625$). Paralelamente e, em relação ao índice cpo, pode constatar-se que a associação verificada foi no sentido de as crianças não diabéticas apresentarem um maior índice cpo do que as diabéticas (Chi-quadrado, $p<0,001$), sem influência do controlo metabólico da doença (t-Student, $p=0,448$).

Considerando o agrupamento metodológico por grupos etários foi possível verificar associações significativas entre os mesmos e os índices CPO e cpo (Chi-quadrado, $p<0,001$ e teste exato de Fisher, $p=0,031$, respetivamente); estes valores representam uma tendência no sentido das crianças mais novas apresentarem menor CPO e maior cpo, facilmente explicável tendo por base a cronologia da erupção dentária. Revelou-se igualmente significativa a associação entre o índice cpo e o género (Chi-quadrado, $p=0,012$), com as crianças do género masculino a apresentarem valores mais elevados de cpo; este facto poder-se-ia, porventura, correlacionar com os hábitos de higiene oral, nomeadamente o nível de percepção/responsabilização, tendencialmente menor nos rapazes, não obstante a maioria dos autores referirem também alterações comportamentais no período da adolescência (fases de transição dentição mista/permanente)^{1148, 1161, 1162}.

Quando atentados os resultados referentes à associação entre os índices de cárie e o número de refeições diárias foi confirmada relevância estatística para a dentição temporária (Chi-quadrado, $p=0,021$), com valores mais baixos de cpo nas crianças que referem cumprir pelo menos cinco refeições diariamente. Não se verificaram diferenças significativas na dentição permanente (Chi-quadrado, $p=0,108$). Já no que concerne aos hábitos gerais de higiene oral e à presença de má oclusão, estes

apenas mostraram alguma associação relevante em relação ao índice CPO (Chi-quadrado, $p=0,005$ e Chi-quadrado, $p=0,014$, respetivamente), factos igualmente reafirmados na literatura ¹¹⁶³⁻¹¹⁶⁶. Com uma aparente surpresa, a tendência da associação demonstra que as crianças com maior CPO são as que apresentam hábitos de higiene oral mais frequentes; uma possível explicação pode residir na experiência negativa prévia de padecer de lesões de cárie ativas e sintomáticas ou uma elevada suscetibilidade à doença “incentivar” as medidas de higiene oral. Se algumas destas associações que, apesar de *a priori* expectáveis, não assumiram significância estatística na amostra em estudo, também é verdade que, tratando-se de uma doença multifactorial, nem sempre a influência etiológica pode e deve ser “padronizada” ou considerada individualmente.

O propósito do cálculo do índice SiC advém do mesmo refletir informação relacionada com a distribuição assimétrica de cárie de forma distinta daquela que é reportada pela avaliação convencional do índice CPO, cuja média não espelha essa assimetria e pode até “aparentar” uma menor gravidade em termos de prevalência ^{483, 498, 499}. Assim, a utilização conjunta destes índices (SiC e CPO) pode ajudar a identificar, de forma mais completa e precisa, grupos de maior risco e, conseqüentemente, maior carência de cuidados curativos e preventivos. A OMS propôs, como objetivo global a atingir até 2015, um índice SiC de 3,0 aos 12 anos ⁴⁹⁸. Em Portugal, de acordo com os dados publicados em 2008, o valor do índice SiC aos 12 anos foi de 3,8 ¹⁰⁷⁴. Na análise da globalidade das crianças desta amostra o valor do índice SiC aos 12 anos foi de $5,80 \pm 1,72$ (mais acentuado); porém, com base em alguns dos argumentos descritos anteriormente não é inesperado que o subgrupo das crianças com melhor controlo metabólico tivesse apresentado um SiC mais baixo ($3,00 \pm 0,00$) cumprindo, inclusivamente, o referido valor “meta” estabelecido pela OMS. Na análise destes mesmos resultados, sublinham-se os valores do índice SiC no grupo dos diabéticos ($3,78 \pm 1,64$), ainda assim melhores do que os apresentados pelas crianças não diabéticas ($5,50 \pm 1,91$), apesar de em ambos os casos (diabéticos e não diabéticos) os valores obtidos tivessem sido superiores aos referidos pela DGS para a generalidade das crianças da mesma idade ¹⁰⁷⁴.

Os resultados deste estudo poderão ser diferentes dos obtidos por outros autores, ou mesmo relativamente aos descritos para a população escolarizada portuguesa da mesma faixa etária, tendo também em conta as particularidades que cada criança apresenta no acesso a cuidados de Medicina Dentária (preventivos ou curativos), muito relacionadas com questões de índole cultural e económica ^{471, 483, 1158}. Mesmo sem diferenças estatisticamente significativas no respeitante, por exemplo, à correlação entre os valores de cpo/CPO e a idade de início dos cuidados de Medicina Dentária ou o nível cultural dos progenitores, há a salientar que esta amostra se compôs por um conjunto de crianças que utiliza de forma preferencial o Sistema Nacional de Saúde, à partida objetivando cuidados essencialmente curativos, o que pode acrescentar algumas condicionantes à desejável aleatorização (viés de Berkson).

Contrariamente ao que poderia porventura considerar-se expectável estando em causa crianças com uma doença crónica e, teoricamente, com recorrências frequentes a consultas médicas, é algumas vezes referido que condicionantes de ordem financeira e de dispêndio de tempo conduzem a uma menor monitorização do seu estado de saúde oral, relegado para segundo plano, o que pode traduzir-se obviamente num aumento de risco, quer de ocorrência, quer de gravidade de patologia oral ^{1042, 1044}. Por outro lado, e segundo dados da DGS relativamente à realidade portuguesa, as crianças com risco aumentado de problemas de saúde oral e dificuldades no acesso aos cuidados médicos pertencem maioritariamente a famílias pobres, minorias étnicas, sem seguros de saúde, fatores que colocam uma

elevada percentagem de crianças em risco de doença oral não tratada; aspetos relacionados com a educação para a saúde, hábitos alimentares e a ausência de programas de saúde oral são, similarmemente, aspectos a considerar¹⁰⁷⁴. Não obstante, em nenhum dos subgrupos considerados no presente estudo se mostrou relevante nos índices de cárie (CPO/cpo), por exemplo, a idade em que estas crianças iniciaram as consultas de Medicina Dentária (Chi-quadrado, $p=0,261$ / $p=0,471$).

Dos dados recentes divulgados para a população juvenil portuguesa relativamente à condição periodontal nenhum aborda especificamente os diabéticos tipo I. Em relação a esta temática, no “II Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais” indica-se uma elevada prevalência de doenças periodontais na população escolar de 12 anos, com 36% a apresentar hemorragia à sondagem e outros tantos a apresentar cálculos; aos 15 anos, a percentagem com evidência de hemorragia diminuiu, aumentando a dos que apresentavam cálculos, o que poderia conduzir a um agravamento da situação periodontal; foi possível ainda verificar que mais de 70% dos jovens entre os 12-15 anos apresentavam cálculos/hemorragia à sondagem, igualmente com variações regionais significativas¹⁰⁷⁴. Num outro estudo levado a cabo numa amostra da população portuguesa com idades compreendidas entre os 6 e os 15 anos refere-se que em 88% das crianças avaliadas foi diagnosticada gengivite^{572, 578}.

Diferentes publicações têm retratado, com maior ou menor nível de evidência, uma predisposição acrescida para inflamação e hemorragia gengival e índices clínicos de placa bacteriana em crianças diabéticas com pior controlo glicémico, quando em comparação com crianças não diabéticas^{544, 605, 630, 637, 638, 673, 680, 681, 1123}; o risco de desenvolver periodontite parece ser igualmente mais acentuado nestes casos^{631, 677}. Cianciola *et al.* em 1982 reportaram uma maior prevalência de periodontite (9,8%) em crianças e adolescentes diabéticas tipo I (11-18 anos), em comparação com as não diabéticas (1,7%)⁶³⁰. Recentemente foi afirmado que as patologias periodontais, com referência à perda de inserção clínica, podem ter início ainda durante a infância destas crianças^{629, 635, 1167, 1168}.

A comparação de grupos de diabéticos e não diabéticos em relação à ocorrência ou gravidade das patologias periodontais deve ter, no entanto, em especial consideração a faixa etária, sobretudo tratando-se de crianças/adolescentes; os pacientes diabéticos demasiado jovens podem não apresentar diferenças significativas uma vez que as manifestações clínicas consistentes tendem a surgir mais tardiamente, já em fase pubertária¹¹⁶⁹. A incidência destas alterações é mais marcada no período pubertário/pós-pubertário e, também nesta fase, a duração e o controlo metabólico poderão ser significativos^{630, 634, 677, 682, 1170-1172}. Autores como Pinson *et al.*, 1995 e de Pommereau *et al.*, 1992, apesar de corroborarem o aumento de inflamação gengival neste período, não confirmaram a influência do controlo metabólico^{590, 637}. Quando analisada a amostra em estudo nesta investigação tendo por base os escalões etários pode perceber-se que as crianças mais velhas apresentavam pior condição periodontal (Chi-quadrado, $p=0,002$), com um risco acrescido cerca de 3 vezes maior de apresentarem hemorragia à sondagem e/ou cálculos: OR=2,630, IC95% (1,413;4,894). Não obstante, a relação dos parâmetros periodontais com a duração da DM (traduzida no número de anos decorridos desde o diagnóstico)(Chi-quadrado, $p=0,530$), ou o seu grau de controlo metabólico (Chi-quadrado, $p=0,237$)(Mann-Whitney, $p=0,554$), não se mostrou estatisticamente significativa. Al-Khabbaz, 2013 sublinham a influência da duração da DM tipo I na acentuação das manifestações gengivais¹¹⁷³.

Mais recentemente tem vindo a ser mencionada a relação de influência mútua (bidirecional) relativamente a estas patologias^{647, 648, 663, 1174, 1175}. Quer em pacientes controlados, quer em pacientes não

controlados metabolicamente, o tratamento da condição periodontal poderá exercer efeitos positivos nos níveis de glicemia, reportando-se a maioria dos estudos à população adulta^{682, 1176}. Não obstante, outras publicações não corroboraram o acréscimo de gravidade da DP associado à DM^{542, 686, 1177, 1178}. É aceite, porém, que ambas as patologias partilham alguns fatores de risco, nomeadamente os de índole microbiológica, genética, relação com alterações de membrana/vasculares, da resposta imunitária e do metabolismo do colagénio, cuja ação pode ocorrer de forma isolada ou sinérgica, sem que se consiga ainda perceber integralmente o(s) mecanismo(s) envolvido(s)^{63, 147, 586, 591, 606, 609, 654, 657, 661, 981, 1178-1183}.

Na amostra que integrou este estudo a presença de hemorragia à sondagem/cálculos foi globalmente detetada em 50% das crianças não diabéticas e em cerca de 70% das diabéticas (ligeiramente mais acentuada nas de valores de $HbA_{1c} > 7,5$), verificando-se diferenças estatisticamente significativas entre os três subgrupos clínicos. Não foi diagnosticado qualquer caso de periodontite juvenil. Verificou-se, de uma forma geral, existir associação significativa entre a condição periodontal e a presença de DM (Chi-quadrado, $p=0,001$), associação no sentido dos pacientes diabéticos apresentarem, de uma forma geral e tendo por base os parâmetros definidos, pior condição periodontal do que os não diabéticos. Foi ainda possível concluir que as crianças diabéticas, independentemente do grau de controlo metabólico apresentado, evidenciavam, em geral, sinais clínicos mais acentuados de degradação periodontal do que as não diabéticas, com um risco 2 a 3 vezes superior de apresentarem cálculos e/ou hemorragia à sondagem.

Em relação ao acréscimo de inflamação gengival, este parece poder ocorrer independentemente das diferenças acentuadas no respeitante aos índices de placa^{63, 590, 605}. Na caracterização da flora periodontal alguns autores referem-se à existência de semelhanças nos microrganismos identificados nos diabéticos e nos não diabéticos, sugerindo que as alterações na resposta imune (função fagocitária) aos agressores periodontais e ligadas ao metabolismo do colagénio seriam as principais responsáveis pelas diferenças em termos de manifestações clínicas nos tecidos periodontais^{604, 608, 981, 1177}. Outros, pelo contrário, apontam para a existência de uma flora “específica”^{1176, 1184, 1185}. Paralelamente, alterações nos já referidos níveis de glicose salivar nos indivíduos com DM (particularmente aqueles com inadequado controlo metabólico) podem fomentar alterações na microflora oral, induzindo diferenças qualitativas nas espécies associadas à gravidade da patologia periodontal^{1186, 1187}. Neste trabalho não foi especificamente avaliada a constituição da microflora periodontopatogénica.

Mais do que a “simples” existência da DM deve ter-se presente a alteração da resposta dos tecidos periodontais a estímulos ou fatores locais¹¹⁸⁶. Um destes predisponentes poderá ser a presença de cálculos dentários, considerada mais marcada nos diabéticos, particularmente nos casos de inadequado controlo metabólico^{63, 427, 547, 564, 1187, 1188}. Um aumento dos níveis de Ca^{2+} salivar (eminentemente atribuído às glândulas parótida e submandibular) pode concorrer para este resultado^{542, 687, 690, 981}. Apesar de indicações recentes de especialistas do painel EGOHID não contemplarem o registo de cálculos por não estar incluído na definição de indicador, este decorreu neste estudo tendo por base a tendência acrescida de formação por parte dos diabéticos. Torna-se, no entanto, difícil distinguir ou separar a real influência deste “irritante” físico de outro tipo de fatores nos sinais clínicos de alterações periodontais.

Uma grande parte das alterações periodontais são, não obstante, largamente evitáveis, mesmo em indivíduos suscetíveis; a progressão destrutiva pode ser modificável sempre que as mesmas sejam

identificadas em estádios precoces de evolução ¹¹⁶⁸. Fatores de risco passíveis de modelação, de que são exemplo os conhecimentos e hábitos relacionados com a higiene oral, revelam-se, nestes casos, tão importantes quanto os comportamentos exigidos relativamente ao controlo glicémico, objetivando a minimização dos riscos de complicações micro e macrovasculares a longo prazo ^{663, 1189}. Por estas mesmas razões as ações e estratégias de prevenção/tratamento de patologia periodontal devem ser integradas no âmbito da abordagem de uma melhoria da saúde global (e não apenas oral) nestas crianças ^{598, 1168, 1189}.

A frequência de escovagem e a presença de má-oclusão revelaram-se, também nesta amostra de crianças estudadas, e corroborando o que é referenciado na literatura, determinantes na condição periodontal, destacando-se positivamente nas crianças que escovavam os seus dentes com maior frequência diária (Chi-quadrado, $p=0,017$) e negativamente nas crianças com má oclusão (Chi-quadrado, $p=0,004$).

Adicionalmente foi constatado que, de entre todas as subpopulação celulares salivares potencialmente envolvidas nos processos inflamatórios, apenas na referente aos LT CD3+ houve diferenças entre grupos, mais marcadas na presença de alterações periodontais (Mann-Whitney, $p=0,014$). A este propósito sabe-se que é a natureza da resposta inflamatória que determina o carácter destrutivo das DP, e que as perturbações nas proporções relativas de células B e T podem refletir as diferenças na “imunopatologia” das lesões de gengivite e periodontite ¹¹⁹⁰. Tem sido concomitantemente reportado que tende a existir uma predominância de células T nas lesões de gengivite e um acréscimo de células B nas periodontites (ainda que sob controlo das células T) ¹¹⁹⁰⁻¹¹⁹². A um aumento de LT CD3+ (bem como de outras subpopulações) associam-se alterações colagénicas dos tecidos periodontais ^{273, 1193, 1194}. Gemmell *et al.*, 2001, por outro lado, demonstraram não existirem diferenças significativas nas percentagens médias das subpopulações de LT CD3+ entre indivíduos saudáveis ou com gengivite/periodontite, o mesmo não se verificando em relação aos LB cuja percentagem aumentou no grupo com periodontite ¹¹⁹⁵.

A presença de leveduras na cavidade oral é comum e, apesar da relevância clínica que a *C. albicans* pode aduzir, o padrão de colonização em crianças não está totalmente caracterizado ⁴¹³. As diferentes espécies *Candida* possuem capacidade para colonizar múltiplas superfícies da cavidade oral incluindo a língua (preferencial para algumas espécies), mucosa jugal/palatina e superfícies duras (dentes, próteses, implantes), integrando a complexa simbiose de microrganismos na placa e saliva ^{407, 409, 1196, 1197}. Apesar de integrar o grupo complexo de colonizadores da mucosa oral perante determinados fatores predisponentes (fisiológicos ou patológicos), pode culminar em estados infecciosos de maior ou menor gravidade, com manifestações locais ou, inclusivamente, sistémicas, destacando-se o já referido dimorfismo (hifas – infeções ativas e sintomáticas/pseudohifas – condição saprofitica) de entre os seus mecanismos de patogenicidade ^{749, 1198-1200}. A este propósito é feita referência à publicação de Starr *et al.*, 2002, na qual se conclui que a *C. albicans* representava entre 75-99% de todos os isolados de leveduras numa amostra de crianças saudáveis (8-11 anos), sendo estes dados dos únicos publicados especificamente em relação a crianças portuguesas; as crianças incluídas não evidenciavam qualquer manifestação clínica de candidíase oral, embora no início da avaliação cerca de 47% estivessem colonizadas ⁴¹³.

Ainda que uma elevada percentagem da população esteja colonizada por *C. albicans* sem evidência clínica aparente, as leveduras estão geralmente presentes em menor número quando

comparadas com as bactérias orais dando azo a questões que continuam, em grande parte, sem resposta clara, nomeadamente: “por que razão apenas uma minoria dos indivíduos colonizados desenvolve infeção?”; “por que razão alguns indivíduos parecem nunca ter sido alvo de colonização?”; “que carga/densidade corresponde a sinais de infeção?”. Parece ser o balanço entre diferentes fatores ligados à “aquisição”, crescimento e “remoção” destas espécies que determina a eventualidade de existir colonização, a sua gravidade e manifestação clínica, com destaque para os mecanismos de adesão ^{1197, 1201, 1202}.

A região do palato por exemplo, segundo referência de Willis *et al.*, 2000, constitui uma região de colonização preferencial, essencialmente por não estar tão acessível às técnicas tradicionalmente empregues na higiene oral ⁷⁹¹. Igualmente antibioterapia recente ou efetuada cronicamente poderá acarretar um risco adicional a ter em conta no favorecimento da colonização ⁴¹³. O mesmo se aplica à utilização de dispositivos ortodônticos no tratamento da má-oclusão, da qual decorrem alterações particulares na cavidade oral, resultando num incremento de estimulação antigénica e colonização fúngica/bacteriana, particularmente em zonas retentivas ^{336, 351, 1203, 1204}; estas questões foram ponderadas na presente investigação e constituíram critérios de exclusão na seleção da amostra (ver II, 2.1.1).

A predisposição dos diabéticos para este tipo de infeções é muitas vezes explicada, no que diz respeito à colonização, pelo aumento da concentração de glicose nos fluidos biológicos; adicionalmente, e em relação à cavidade oral, para além da eventual presença de elevados níveis de glicose salivar, a já mencionada redução do fluxo salivar poderá, também neste caso, potenciar a multiplicação e adesão das leveduras ao epitélio oral, aumentando a sua patogenicidade ^{413, 768, 774, 800, 979, 1205}. Darwazeh em 1991, e mais recentemente Bremenkamp em 2011, não detetaram, por outro lado, diferenças estatisticamente significativas na frequência e número de colónias (UFC/mL) entre diabéticos e controlos saudáveis, dando relevo ao controlo glicémico da DM ^{774, 1205}. Estas questões continuam ainda envoltas em grande controvérsia.

Do conjunto de crianças incluídas neste estudo foram colhidos dois tipos de amostras biológicas (saliva e esfregaço da mucosa oral) objetivando a caracterização dos perfis de colonização da cavidade oral por leveduras. Os diferentes métodos preconizados para a obtenção de amostras e identificação de *Candida spp.* são passíveis de influir nos resultados obtidos ^{409, 413, 414}. Cumprindo uma uniformização na técnica e aumentando o número de zonas determinadas para efetuar as colheitas conseguiu reduzir-se, conforme descrito por outros autores, o número de potenciais falsos-negativos ^{409, 413}. Globalmente pode constatar-se que a maioria destas crianças, sendo diabéticas ou não, e independentemente do grau de controlo glicémico, apresentavam a sua cavidade oral colonizada por leveduras (cerca de 60%); salienta-se neste caso, uma vez mais, a importância que a adesão ao epitélio oral assume em termos de patogenicidade ^{730, 781, 1206}. De qualquer forma, não puderam ser verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste de Kruskal-Wallis)($p>0,05$) entre grupos para a variável “presença de leveduras na saliva/mucosa”.

Quando analisada de forma particular a presença de leveduras na saliva/mucosa pode concluir-se não terem sido, de forma transversal, estatisticamente significativos (Chi-quadrado, $p>0,05$) os resultados relativos à presença de DM, ao grau de controlo metabólico, idade, género, local de residência, frequência de escovagem dentária, frequência de consumo de guloseimas e número de refeições diárias. A presença de leveduras na saliva não se revelou, da mesma forma, em qualquer dos

subgrupos clínicos, dependente do fluxo salivar estimulado (Chi-quadrado, $p=0,992$) ou capacidade tampão salivar (Chi-quadrado, $p=0,526$), verificando-se o mesmo nas amostras de mucosa (Chi-quadrado, $p=0,688$)(Mann-Whitney, $p=0,932$), ainda que estas características possam considerar-se elementos importantes do sistema de defesa, essencialmente pelas ações enzimática e mecânica^{208, 308}. A duração da DM parece não ter, também neste caso, influenciado decisivamente os padrões de colonização, quer na saliva (Chi-quadrado, $p=0,593$), quer na mucosa (Chi-quadrado, $p=0,324$), eventualmente por estarem em causa crianças com um período médio de duração da doença não muito extenso ($5,2\pm 3,4$ anos). Parte destes resultados foram previamente corroborados por outros autores^{337, 781}.

O exame oral para o diagnóstico de *Candida spp.* pode ser muito limitado uma vez que mesmo sendo possível demonstrar a sua presença e quantificação em meio oral nem sempre existem, conforme aludido anteriormente, manifestações clínicas concomitantes; de acordo com Al-Attas e Amro, 2010 e Soysa *et al.*, 2006, mesmo em indivíduos com carga significativa de leveduras poderão não ser evidentes sinais de infeção^{331, 433}. Epstein *et al.* em 1980 referem inclusivamente a possibilidade de distinguir indivíduos “portadores” de indivíduos com manifestações clínicas tendo por base a quantificação de culturas (UFC) de *C. albicans*, sendo que estes últimos apresentariam uma concentração de leveduras >400 UFC/mL de saliva, limite que corresponderia a um “indicador clínico”, apesar de contestado por alguns autores e não assumido, de forma generalizada, como valor de referência^{1207 cit in 430, 781, 1208}. Mesmo que o grau de colonização (carga) possa não ser traduzido em manifestações clínicas é razoável admitir a hipótese das barreiras naturais “anti”- colonização serem um ponto chave do problema, com diferenças interindividuais em função, por exemplo, da idade^{745, 770, 1209}.

No caso particular dos diabéticos, mesmo considerando que a carga de leveduras possa assumir-se enquanto parâmetro preditivo na progressão de infeções, também esta relação não deve ser arrogada de forma direta⁴³³. Em relação ao tipo de DM os diabéticos tipo I parecem exibir um grau de colonização maior do que os tipo 2, o mesmo não se confirmando invariavelmente com a carga se comparados diabéticos com não diabéticos^{337, 340, 357, 432, 433, 775, 781}. No presente trabalho, e no que respeita mais especificamente à carga, apurou-se, sem grande relevo em termos de diferenças percentuais, que as crianças diabéticas apresentaram globalmente um número mais elevado de colónias (UFC/mL de saliva ou esfregaço); o subgrupo de crianças com $HbA_{1c} > 7,5$ foi o mais representativo nos intervalos de maior carga (≥ 1000 e $101-999$) sem que se tivesse, no entanto, detetado um acréscimo de infeções ou manifestações clínicas evidentes neste subgrupo em particular; de entre as 205 crianças analisadas no total, apenas em três se verificaram alguns sinais, não graves, de infeção, sob a forma aparente de glossite rombóide mediana. Autores como Guggenheimer *et al.* em 2000 correlacionam uma incidência aumentada destas infeções com determinados fatores, referenciando os hábitos tabágicos e a presença de próteses dentárias, à partida ausentes em crianças⁷³⁸. Já os valores mais baixos de carga/densidade de leveduras (≤ 10 UFC/mL saliva ou esfregaço de mucosa) foram detetados maioritariamente nas crianças não diabéticas, com maior homogeneidade entre os subgrupos no intervalo com cargas compreendidas entre $11-100$ UFC/mL.

Na saliva das crianças não diabéticas foram quantificadas, em média, $116,80\pm 261,03$ UFC/mL, enquanto na mucosa o número foi substancialmente menor - $55,80\pm 275,62$ UFC/esfregaço. O mesmo se aplica às crianças diabéticas cujos valores médios de carga rondaram na saliva $143,62\pm 272,38$ UFC/mL

e na mucosa $89,08 \pm 251,43$ UFC/esfregaço. Salientam-se, em ambos os casos, os elevados valores de desvio padrão (traduzindo uma forte variabilidade de resultados), devendo atentar-se ainda à acentuação dos valores médios de carga no grupo de diabéticos não controlados (≥ 1000 UFC/mL ou esfregaço), sobretudo na mucosa ($129,07 \pm 306,41$), hipoteticamente explicada pela maior concentração de glicose nos biofluidos, influenciando o crescimento excessivo de leveduras, a sua fixação, colonização às células do epitélio e formação de biofilmes^{774, 789, 955, 965, 1124}. Diferenças em termos de expressão e número de receptores ou dimensão das células epiteliais, afetadas por alterações de ordem hormonal e nutricional podem estar, da mesma forma, na base destas variações¹²⁰¹.

Na saliva a ausência de leveduras foi mais marcada nas crianças com valores mais baixos de HbA_{1c} (42,4%), o mesmo acontecendo se considerado a mucosa (73,3%), sendo algo próximos os valores referentes às não diabéticas e diabéticas com inadequado controlo glicémico, considerando-se não significativamente determinante a presença de DM ou o seu grau de controlo metabólico [(Chi-quadrado, $p=0,534$) e (Chi-quadrado, $p=0,862$)(Mann-Whitney, $p=0,990$)]. De uma forma geral constatou-se existirem mais crianças diabéticas com adequado controlo glicémico não colonizadas do que crianças não diabéticas; uma das razões potencialmente relacionadas poderá, também neste caso, prender-se com a hipótese das crianças (e adultos, de uma forma geral) com doenças crónicas (DM, incluída) serem sujeitas, hoje em dia, por norma, a um acrescido nível de cuidados tendo em conta o risco de complicações associadas.

Abordando a questão da biodiversidade, a espécie mais frequentemente isolada foi a *C. albicans* (em consonância com o reportado na maioria das publicações consultadas), correspondendo as restantes (não-*albicans* e não-*Candida*) a 11% do total de isolados na mucosa e 14% na saliva^{336, 735, 775, 782, 789}. A maior biodiversidade foi detetada na saliva, com um total de onze espécies diferentes de leveduras, enquanto na mucosa esta variabilidade se reportou a seis espécies. Apenas uma criança apresentou mais do que uma espécie na saliva (*C. albicans* e *F. capsuligenum*); as espécies colonizadoras da superfície mucosa nem sempre foram coincidentes com as isoladas na saliva, verificando-se ainda uma “conjugação” de *C. albicans* + *F. capsuligenum* numa amostra de saliva de uma das crianças diabéticas.

A dimensão da expressão das espécies não-*albicans* e não-*Candida* na ocorrência de infeções sintomáticas tem sido repetidamente descrita nas últimas duas décadas tendo por base a melhoria da sensibilidade da maioria dos métodos de diagnóstico mais recentes, mas também a influência das terapêuticas imunossupressoras e uso de antibioterapia de largo espectro^{787, 1210-1212 cit in 789}. Curiosamente, neste estudo, foi possível constatar que, das três crianças com evidência de glossite rombóide mediana, uma estava colonizada na mucosa por *C. dubliniensis*. As crianças diabéticas incluídas nesta amostra apresentaram *C. albicans* nos isolados de saliva (relativamente às outras espécies) com maior frequência do que as não diabéticas (Chi-quadrado, $p=0,016$; OR = 3,875, IC95% (1,221; 12,302), com particular ênfase para os diabéticos não controlados (Chi-quadrado, $p=0,025$; OR=4,3668, IC95% (1,112; 12,302), o que está de acordo com o referido por alguns autores^{337, 735, 773}.

Outro parâmetro avaliado - o número de refeições cumpridas diariamente - revelou-se potencialmente influente no tipo de espécies de leveduras, desta vez na mucosa (Teste exato de Fisher, $p=0,020$), com uma probabilidade cerca de dez vezes superior - OR=10,416 IC95% (1,206; 90,909) - dos pacientes que ingeriam mais refeições diárias apresentarem *C. albicans* nos isolados (em detrimento de “outras espécies”). Através da aplicação complementar do índice de Simpson (IS) enquanto meio de

avaliação da biodiversidade foi possível comprovar que, comparando os diferentes subgrupos (IC95%), a biodiversidade salivar foi mais acentuada nas crianças não diabéticas [IS:0,4441 (0,4163; 0,4719)] e não significativamente diferente entre os subgrupos de diabéticos - $HbA_{1c} \leq 7,5$ [IS:0,1700 (0,1281; 0,2118)] e $HbA_{1c} > 7,5$ [IS:0,1681 (0,1467; 0,1895)]; a idade não foi um fator diferenciador de biodiversidade e a mesma foi significativamente inferior no grupo de maior duração da DM - >5 anos – [IS:0,0541 (0,0378; 0,0703)] e nas crianças do género masculino [0,2175 (0,1998; 0,2352)]; a biodiversidade salivar foi ainda significativamente superior nos grupo de crianças com residência urbana (IS:0,3632 (0,3235; 0,4029)) e naquelas que não efetuavam qualquer escovagem dentária diária [IS:0,4441 (0,4163; 0,4719)], não existindo no entanto diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que escovam os dentes com maior ou menor frequência. Remetendo à biodiversidade das amostras de mucosa esta foi, à semelhança do verificado nas amostras de saliva, significativamente superior nas crianças não diabéticas [IS:0,3177 (0,2778; 0,3577)], com diferenças relevantes sobretudo no respeitante aos diabéticos não controlados metabolicamente [IS:0,1230 (0,0961; 0,1499)] e com maior duração da DM [IS:0,1508 (0,1151; 0,1864)]; também neste caso a idade não pareceu constituir um factor diferenciador entre os subgrupos. Contrariamente ao verificado para a saliva, o local de residência (rural/urbana) e a frequência de escovagem dentária não se revelaram fundamentais (neste último caso apenas algumas diferenças no grupo cuja frequência de escovagem foi ≤ 2 x dia [IS:0,2233 (0,2050; 0,2415)].

Com alguma surpresa comprovou-se serem as crianças não diabéticas a apresentar uma maior biodiversidade, uma vez que alguns autores reconhecem a DM enquanto factor predisponente, ainda que na associação particular a hábitos tabágicos e uso de dispositivos protéticos, conforme previamente referenciado (não aplicáveis a estas crianças)^{433, 779}. No seguimento destes resultados poder-se-ia ainda colocar uma suposta relação com diferentes práticas dietéticas, dado grande parte das espécies isoladas serem tipicamente alimentares^{1202, 1213}. Também a higiene oral poderá, a este mesmo propósito, exercer eventuais efeitos nos padrões de colonização muito embora, através da aplicação do referido índice, se tenham obtidos resultados díspares. No que concerne à idade (e também higiene oral) é referido, no entanto, que as crianças na primeira infância parecem apresentar maior susceptibilidade à colonização por microrganismos oportunistas, em parte devido à imaturidade do sistema imunitário, ao incompleto estabelecimento/maturidade da microflora oral e ao maior número de infeções sistémicas a que estão sujeitas, podendo a submissão a tratamentos dentários, hábitos de amamentação, dietéticos (já referidos), respiração bucal e melhoria dos cuidados higiénicos tornar-se determinantes^{409, 411-415, 417, 745, 752, 753, 760, 1214, 1215}.

Alguns estudos têm tentado esclarecer o real contributo das leveduras na etiologia da cárie dentária tendo por base a capacidade de colonização de superfícies duras, invasão dos túbulos dentinários e produção de inúmeros ácidos e catabolitos que contribuem para a desmineralização do esmalte, interferindo ainda na resposta imunitária do hospedeiro^{1216, 406, 410-413, 415, 420, 1214, 1217-1220}. A elevada prevalência de *Candida spp.*, quer na placa enquanto elemento integrante do biofilme, quer na saliva, pode correlacionar-se com a atividade de cárie dentária persistindo, porém, ausência de evidência científica suficiente a este propósito^{407, 415-417, 420, 760, 761, 1214, 1218, 1221}.

Akdeniz *et al.* em 2002 apontaram para uma prevalência de *Candida* de 69,2% em crianças com mais de quatro dentes cariados, ao passo que nas crianças livres de cárie essa prevalência estava reduzida a 5%¹²¹⁵. Complementarmente, no já referenciado estudo de Starr *et al.*, 2002 é apontado um

decréscimo acentuado na colonização da cavidade oral de crianças (8-11 anos) após submissão a tratamento dentário e uma melhoria significativa dos hábitos de higiene oral, com uma redução de quase 50% desde a primeira avaliação até 36 meses após o tratamento dentário e melhoria nos cuidados de higiene oral ($p < 0.0005$)⁴¹³. Contudo, no presente estudo, através da análise dos resultados obtidos, e correlacionando a presença de leveduras quer na mucosa, quer na saliva, com os valores referentes aos índices cpo, CPO e frequência de escovagem dentária, não foi encontrada qualquer tipo de associação com relevância estatística.

Tem sido referenciada uma hipotética correlação entre a colonização por *C. albicans* e por *Lactobacillus*, eventualmente baseada no facto das crianças com má higiene oral tenderem a ter níveis mais elevados de todo o tipo de microrganismos na sua cavidade oral, conquanto nem sempre parece consistente a hipótese dos *Lactobacillus spp.* serem suscetíveis de proteger contra a infeção por *C. albicans*, mesmo podendo condicionar-se mutuamente^{409, 413, 1222-1224}. Neste estudo pode apenas ser comprovada uma associação significativa (Mann-Whitney, $p=0,036$) entre a carga bacteriana e a carga de leveduras salivares, no sentido dos pacientes com menor carga de leveduras apresentarem igualmente menor carga bacteriana.

Métodos analíticos (nos quais se inclui a ¹H-RMN) permitem quantificar um grande número de metabolitos de diferentes biofluidos e, desta forma, identificar prováveis biomarcadores de múltiplas patologias, a par de alterações em diferentes vias bioquímicas^{906, 914, 923, 1225}. Especificamente na área da DM têm sido descritas algumas destas alterações, correlacionando-se perfis bioquimicamente relevantes, metabólicos em particular, com a expressão clínica e a ocorrência de complicações; desta forma, e tomando por base a desejável identificação precoce destes biomarcadores, vislumbra-se a possibilidade de prever o aparecimento da doença^{138, 890, 916, 928, 1226}. Em relação concretamente à DM tipo I, e ainda que se adivinhem profundas alterações nas vias metabólicas decorrentes da ausência de insulina, as mesmas não foram, até à data, totalmente clarificadas, com as publicações a fazerem mais frequentemente menção à DM tipo 2^{110, 872, 1227}. Para além da elevação da glicose plasmática, cetonas e de aminoácidos de cadeia ramificada (“marcas” da deficiência de insulina na DM tipo I), também o lactato e a alanina poderão, de forma mais ou menos pronunciada, apresentar um aumento de concentração plasmática, consistente com um acréscimo da neoglicogénese por via dos ciclos da glicose-alanina e de Cori (via glicose-lactato-glicose), mecanismos que suprem a necessidade de alguns tecidos obterem glicose continuamente^{1227-1229, 928, 1230-1233}. Da mesma forma o perfil proteico parece alterado no sentido dum acréscimo nos indivíduos diabéticos, apontando-se uma presumível relação com a duração/curso da doença^{162, 1234}.

O contributo diagnóstico por parte de diferentes amostras biológicas (nas quais se inclui a saliva) tem sido dinamicamente perspetivado em diferentes estados patológicos¹²²⁶. A saliva contém, à semelhança do que se verifica no plasma, uma multiplicidade de componentes cuja concentração se encontra especificamente alterada na DM, alguns dos quais com o referenciado potencial diagnóstico⁹⁶²; a glucose, α -amilase, grelina, diferentes imunoglobulinas, oxidantes e AGEs são considerados potenciais biomarcadores salivares da DM^{563, 929, 1235, 1236}. Na análise do perfil metabolómico salivar obtido na amostra em estudo puderam globalmente ser verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste de Mann-Whitney) entre grupos em relação às concentrações salivares de alanina ($p=0,023$), etanol ($p=0,001$), malato ($p < 0,001$) e butirato ($p < 0,001$); à exceção do butirato, a tendência foi para uma

concentração salivar tendencialmente maior nos não diabéticos. Já em relação ao propionato, lactato e acetato estas diferenças não evidenciaram, entre grupos, diferenças relevantes em termos estatísticos. Na avaliação da concentração média (em μM) destacaram-se o acetato ($3,3165 \pm 4,7462$) e o malato ($0,9418 \pm 2,1900$) no subgrupo dos não diabéticos, e o acetato ($3,1161 \pm 5,3839$) e o propionato ($0,7269 \pm 1,9333$) no subgrupo dos diabéticos.

Os hidratos de carbono complexos (tais como as fibras da dieta) são metabolizadas pela flora intestinal em oligo e monossacarídeos e transformados posteriormente, através de processos fermentativos, maioritariamente em acetato, propionato e butirato. Os ácidos gordos de cadeia curta são absorvidos no cólon; o butirato fornece energia às células epiteliais, enquanto o acetato e o propionato se direcionam preferencialmente para o fígado, tornando-se substratos para a lipogénese e neoglicogénese, respetivamente. A microflora intestinal tem sido apontada como elemento ambiental influente nos processos metabólicos, associando-se à etiologia de diferentes patologias nas quais se inclui a DM, não estando totalmente esclarecida esta potencial influência em humanos ¹²³⁷. No caso particular da concentração salivar de butirato, significativamente aumentada no grupo dos diabéticos (Mann-Whitney, $p < 0,001$), Gao *et al.* em 2009 referiram que a administração de suplementos dietéticos de butirato poderia ter algum efeito nos mecanismos de resistência à insulina no rato; o mecanismo subjacente à ação do butirato estaria relacionado com a promoção de gasto energético e indução da atividade mitocondrial ¹²³⁸.

Para nenhum dos metabolitos estudados na saliva destas crianças diabéticas se constatou relevância no que concerne à influência, quer do grau de controlo metabólico, quer da duração da doença.

A propósito desta caracterização de biomarcadores salivares há que atender a que, quer o tipo de saliva (total/glandular específica), quer o tipo de estimulação (não estimulada/estimulada) poderão condicionar os resultados ¹²³⁹. A maioria dos estudos tem feito uso de saliva total, de mais fácil colheita (conquanto mais sujeita a influência de fatores patológicos da própria cavidade oral) e, eventualmente, mais vantajosa em estudos que visam a resposta imunitária em diferentes distúrbios orais/sistémicos; a saliva glandular específica proporciona informação particularmente relacionada com patologia glandular, não sofrendo tanta influência de outros estados patológicos da cavidade oral. A utilização de saliva total, e atendendo à complexidade na sua composição, deve contemplar a possibilidade de, em termos analíticos, a atividade enzimática e os seus produtos poderem resultar de uma origem bacteriana/microbiológica marcada ^{872, 931, 935, 1226}.

Outra questão deve ser ainda relevada: embora a saliva estimulada tenda a ser menos concentrada do que a não estimulada, o grau de diluição não acontece de forma uniforme para cada um dos metabolitos. De acordo com a análise levada a cabo por Takeda *et al.* em 2009 a concentração da maioria dos metabolitos sofre um decréscimo após estimulação com citrato; de entre os metabolitos estudados por estes autores a alanina, a dimetilamina, o lactato e o piruvato sofreram menor diluição do que o acetato, a acetona, o formato, a glicose, a glicina, o succinato, a sacarose, a fenilalanina, o propionato, a taurina e a tirosina; o metanol e a ureia não sofreram alterações significativas e o propileno-glicol aumentou após estimulação ⁸³². Por outro lado a saliva produzida pelas glândulas parótida e submandibular difere em termos de composição, sendo maior a viscosidade na saliva advinda da submandibular ¹²⁴⁰; acresce ainda a influência potencial no conteúdo proteico em função da existência de

estimulação¹²⁴¹. Se em repouso (ou ausência de estimulação) a principal fonte de produção salivar advém das glândulas submandibulares, já após estimulação o contributo para a saliva total por parte das parótidas duplica, sendo mais marcada a presença de aminoácidos, piruvato e lactato^{832, 1242-1244} cit in⁸³². Nesta amostra em particular, a colheita foi efetuada após estimulação com parafina; na ponderação da influência do fluxo salivar estimulado (e capacidade tampão) na concentração dos diferentes metabolitos isolados não houve, no entanto, qualquer diferença relevante em termos estatísticos.

Ainda que de forma mais “convencional” seja ponderável a existência de um biomarcador específico para cada doença, esta assunção simplista pode ser verdadeira para algumas patologias, muito embora a maioria destas encerrem, em si mesmas, um conjunto de “condições” (ou mesmo “subpatologias”) que tornam complexa a sua “compartimentação” e identificação tácita. Outra das condicionantes, no caso peculiar da cárie dentária e da DP, tem por base a sua etiologia multifatorial, colonização microbiana e resposta do hospedeiro. Já em relação ao diagnóstico clínico das infeções por leveduras através da análise de metabolitos os dados são muito escassos e, até à data, as amostras salivares têm sido basicamente empregues no isolamento de espécies exigindo-se, reconhecidamente, uma maior optimização técnica atendendo a variações de sensibilidade e especificidade^{1226, 1245}.

Na análise da relação entre a presença de leveduras na saliva e os diferentes metabolitos foram constatadas, neste estudo, associações estatisticamente significativas (Mann-Whitney) com acentuação da concentração salivar de propionato ($p < 0.001$), alanina ($p = 0.006$), etanol ($p < 0.001$), acetato ($p < 0.001$), butirato ($p = 0.017$), formato ($p = 0.002$); na presença de leveduras na mucosa foram acentuadamente mais relevantes (Mann-Whitney) as concentrações de propionato ($p = 0.012$), etanol ($p = 0.020$), acetato ($p = 0.006$) e formato ($p = 0.044$). Na carga de leveduras na saliva as correlações não foram acentuadas, ainda assim verificadas em relação ao propionato (Coeficiente de Spearman = 0,214, $p = 0,003$), alanina (Coeficiente de Spearman = 0,19, $p = 0,007$), etanol (Coeficiente de Spearman = 0,222, $p = 0,002$), acetato (Coeficiente de Spearman = 0,232, $p = 0,001$) e formato (Coeficiente de Spearman = 0,203, $p = 0,004$); na carga na mucosa verificou-se alguma significância estatística relativamente às concentrações salivares de propionato (Coeficiente de Spearman = 0.184, $p = 0.009$), etanol (Coeficiente de Spearman = 0.174, $p = 0.014$), acetato (Coeficiente de Spearman = 0.200, $p = 0.004$) e formato (Coeficiente de Spearman = 0.164, $p = 0.020$). A concentração salivar de malato mostrou particular relevância (Mann-Whitney, $p = 0,0012$) nas crianças que apresentavam *C. albicans* na mucosa (relativamente a outras espécies). A este propósito cabe acrescentar que a “transição morfológica” constitui um factor essencial para a virulência da *C. albicans* estando a sua morfogénese determinada por sinalização ambiental, nomeadamente disponibilidade enzimática (acetil-CoA, algumas enzimas do ciclo de Krebs) e aminoácidos¹²⁴⁶⁻¹²⁴⁸. Parece igualmente provável que a *C. albicans* possa alterar as vias metabólicas para utilizar fontes de carbono alternativas em resposta a alterações do meio - reprogramação metabólica - decisiva em termos de virulência, ainda que este mecanismo não aparente acentuada significância^{1247, 1249}.

Diferentes biomarcadores são analogamente associados à ocorrência de DP, nomeadamente as MMP-8, MMP-9 e determinados perfis proteicos, contribuindo para um aumento da fiabilidade de diagnóstico; estas associações carecem, no entanto, de um maior grau de evidência^{1226, 1250-1255}. Neste estudo nenhum dos metabolitos salivares isolados demonstrou estar associado de forma estatisticamente significativa com a condição periodontal em qualquer um dos subgrupos.

Relativamente ao diagnóstico e avaliação da susceptibilidade à cárie dentária, a tentativa de

identificação de biomarcadores tem sobretudo assentado, à semelhança do que em parte acontece na DP, em alterações de perfis proteicos salivares e à ação dos ácidos orgânicos^{1226, 1256, 1257}. O acetato e o piruvato são os elementos mais preponderantes na descida de pH resultante dos processos metabólicos, coexistindo concentrações variáveis de formato, lactato, succinato e propionato. O ácido pirúvico (piruvato, na sua forma ionizada) é um poderoso dador de prótons, capacidade esta mais marcada do que a atribuída ao ácido láctico na etiologia da cárie dentária^{800, 936, 1258}. A conjugação e prevalência das bactérias aeróbias e anaeróbias na cavidade oral exercem um efeito marcado na natureza e distribuição destes ácidos orgânicos^{1259, 1260}.

Os elevados níveis de acetato, propionato e n-butirato surgem como resultado da degradação proteolítica levada a cabo pelos complexos sistemas enzimáticos que as bactérias apresentam, mecanismos estes dependentes de fontes de hidratos de carbono exógenas¹²⁶¹. O glutamato e a prolina (também em relação com as PRP, tais como o colagénio) são usados, entre outros, por determinadas bactérias aeróbias Gram-, o glutamato reconvertido a acetato e a prolina a lactato, piruvato e acetato; também o lactato pode ser metabolizado em acetato e propionato. Todos estes processos metabólicos assumem particular relevância em indivíduos altamente susceptíveis à cárie dentária. O acetato e o formato são formados a partir do metabolismo dos hidratos de carbono em condições de aerobiose e excesso de glucose via piruvato-formato-liase ou, em aero ou anaerobiose, a partir da galactose^{1262, 1263, 1264, 1265} cit in¹²⁵⁸. Calandra e Adams, num estudo da década de 50, mencionam que a hipotética disponibilidade de determinados sistemas enzimáticos capazes de efetuar uma rápida oxidação de ácido láctico/lactato poderá explicar parte dos mecanismos envolvidos na imunidade à cárie dentária¹²⁶⁶ cit in¹²⁵⁸.

Admitindo que níveis mais elevados de lactato possam estar eventualmente relacionados com a metabolização acrescida de glucose por parte da flora oral toma-se todavia necessário perceber quais os mecanismos implicados em concreto⁸³². Se o propionato reflete, muito provavelmente, o crescimento e preponderância do metabolismo dos diferentes microrganismos presentes na cavidade oral, já a alanina salivar não parece ter origem nas bactérias ou resíduos alimentares, mas dever-se-á antes à acentuada atividade metabólica das glândulas salivares¹²⁶⁷⁻¹²⁶⁹. Em relação aos *S. mutans*, um dos mecanismos geradores de ATP é a fermentação maloláctica, considerado um mecanismo secundário de fermentação na presença de L-malato no meio¹²⁷⁰. Este tipo de fermentação pode ser levada a cabo por outros espécies do género *Streptococcus* (que não o *S. mutans*) e *Lactobacillus*. A presença de L-malato contribui, de forma decisiva, para a sobrevivência dos *S. mutans* em situações de baixo pH; a referida fermentação maloláctica constitui uma estratégia de recurso, por parte das bactérias acidúricas, para poderem competir, em vantagem, com outras bactérias da placa nessas condições particularmente agressivas^{1270, 1271}.

Na análise levada a cabo neste estudo não se verificou qualquer relação estatisticamente significativa entre os índices CPO/cpo, e os tipos de metabolitos isolados; quanto à carga bacteriana salivar apenas se constatou relevância estatística no respeitante à concentração de lactato (Mann-Whitney, $p=0,019$), com menor concentração verificada no grupo de maior carga bacteriana, resultado aparentemente contraditório tendo em conta o atrás exposto. Esta aparente contradição poderá ser explicada pelo facto das bactérias não apresentarem exclusivamente metabolismo anaeróbio; com efeito, uma maior carga bacteriana e maior prevalência de metabolismo aeróbio conduz necessariamente a uma

redução mais acentuada dos níveis de piruvato e lactato presentes na saliva por oxidação no ciclo de Krebs.

Também a frequência de escovagem dentária poderia, previsivelmente, constituir um factor de marcada influência no perfil metabólico salivar pela ação depurativa alimentar e condicionante da organização dos microrganismos da placa, ou mesmo por ação do dentífrico; não foram, no entanto, verificadas diferenças/associações relevantes na concentração salivar de qualquer um dos metabolitos em relação à frequência de escovagem dentária.

Está descrito que o consumo de bebidas alcoólicas parece representar a principal fonte de etanol salivar, facto não expectável na amostra considerada neste estudo pelo que, por hipótese, este componente poderá advir igualmente do metabolismo bacteriano dos hidratos de carbono (*S. mutans*, de forma particular) ¹²⁷² cit in ⁸⁸³. Um estudo do mecanismo da ação diabetogénica do etanol concluiu que este pode conduzir a resistência aguda à insulina e constituir nestes indivíduos uma fonte importante de recurso energético ¹²⁷³. Em relação a este parâmetro foram observadas na amostra diferenças estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p=0,001$) entre os grupos de diabéticos/diabéticos controlados e de não diabéticos, com valores superiores nos não diabéticos.

Num estudo de Walsh *et al.* datado de 2006 objetivando a compreensão da influência da dieta na variação metabólica em humanos o acetato foi identificado como metabolito salivar alvo da principal flutuação de concentração na relação direta do período do dia/noite em que foi medido. A elevação de concentração de acetato nas amostras colhidas no período noturno poder-se-ia dever, de acordo com os autores, quer a fontes exógenas, quer a processos fermentativos na cavidade oral decorrentes da ingestão alimentar prévia, tendo no entanto em conta as diferenças de vascularização da cavidade oral. Os mesmos autores concluem que o momento em que é efetuada a colheita e a proximidade de ingestão alimentar poderão constituir fatores de enviesamento dos resultados exigindo-se, por essa mesma razão que sejam, tanto quanto possível, padronizados ⁹¹². Não foram, não obstante, detetadas quaisquer associações ou diferenças estatisticamente significativas em relação à concentração salivar de acetato tendo em conta, neste estudo, a condição ser diabético ou não diabético (Mann-Whitney, $p=0,425$).

As alterações nas concentrações de uma grande parte dos metabolitos têm similarmemente sido relacionadas com a idade, não especificamente em relação à saliva, mas a outro tipo de biofluidos; exemplo destes são o citrato, a glicina, o succinato e a creatinina, cuja concentração tende a diminuir com a idade ¹²⁷⁴⁻¹²⁷⁶ cit in ⁹¹³. Neste estudo a correlação com a variável idade apenas se mostrou significativa (Mann-Whitney) no caso concreto da concentração salivar da alanina ($p=0,009$), superior no grupo dos 12-15 anos. A alanina pode resultar da ação da alanina aminotransferase (ALT) no piruvato, pelo que maiores níveis de piruvato poderão estar na origem de maiores níveis de alanina no plasma e consequentemente na saliva; é reconhecido que numa transição de metabolismo neonatal para metabolismo mais adulto a componente glicolítica desempenha um papel menos prevalente quando comparada com a oxidativa, ou seja, o acoplamento entre metabolismo glicolítico e oxidativo (ciclo de Krebs) é mais eficaz, podendo assim justificar a maior concentração de alanina.

Para além da secreção salivar no geral, também ao nível dos metabolitos, o tipo de estimulação e o género pode marcar algumas disparidades. Diferentes metabolitos - acetato, formato, glicina, lactato, metanol, propionato, propileno glicol, piruvato, succinato e taurina - apresentaram diferentes

concentrações tratando-se de indivíduos do género masculino/feminino⁸³². A existência destas diferenças pode ser identicamente constatada noutros biofluidos - sangue e urina¹²⁷⁷. Já as diferenças nos níveis de acetato, formato, glicina, propionato, piruvato, succinato e metanol podem ser produto, quer de alterações na flora oral, quer de diferenças hormonais (particularmente estrogénio)¹²⁴⁰. No presente estudo, e quanto à variável “género”, esta apenas revelou diferenças estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p=0,013$) na concentração salivar de butirato, superior no género masculino.

Ainda que muitos dos componentes salivares, inorgânicos e orgânicos, inclusivamente presentes no sangue e passíveis de mensuração salivar, estejam relativamente bem caracterizados, o mesmo não tem sido verificado com os componentes celulares^{240, 1278-1280}. Especial atenção foi dada aos leucócitos salivares em estudos realizados nos anos 60 e 70, particularmente no contexto de inflamação local (por exemplo, doenças periodontais)¹²⁸¹⁻¹²⁸³ cit in¹²⁸⁰. Na sua maioria constatou-se tratarem-se de PMN neutrófilos advindos do fluido crevicular, achado que acabou por condicionar o sentido da investigação adicional, focada principalmente na influência do número e/ou a função dos PMN neutrófilos nas patologias orais^{243, 245, 1284-1288}.

A utilização direta do fluido crevicular como fonte analítica não tem constituído, na maioria dos testes diagnósticos, a primeira opção; a dificuldade e morosidade técnica que acarretam a sua colheita e a limitação anatómica dos locais passíveis de utilização para obtenção das amostras induzem a que a colheita e análise de saliva resolva algumas destas condicionantes, mas não a sua totalidade^{611, 825}. Uma vez que os mediadores inflamatórios presentes no fluido crevicular gengival estão continuamente em contacto e misturados no fluido salivar assume-se que a amostra de saliva total poderá constituir uma alternativa simples de determinação deste tipo de analitos²⁷².

Partindo do mesmo pressuposto de que a maior parte dos leucócitos salivares serão oriundos do sulco crevicular Friedman e Klinkhamer, num estudo que data há já algumas décadas, fazem menção a que determinadas subpopulações (granulócitos, especificamente) possam estar aumentadas na saliva previamente ao aparecimento de sinais clínicos da gengivite¹²⁸⁹ cit in⁶¹¹. O número de leucócitos salivares foi também diretamente relacionado com estados de periodontite e, particularmente, gengivite, neste caso por Schiott e Loe em 1970 e, mais recentemente, por Aps *et al.* em 2002^{240, 1288} cit in¹²⁸⁰; no entanto, o método empregue por estes últimos autores não permitiu uma determinação específica de subpopulações celulares. Scully em 1982 refere, por outro lado que, quer os leucócitos salivares (tratando-se, de saliva não estimulada), quer os leucócitos creviculares, revelaram atividade fagocítica e destrutiva de *Streptococcus spp.*, contribuindo paralelamente para as defesas orais através do provimento de proteínas antimicrobianas; esta capacidade foi diminuindo, por aumento de inviabilidade, à medida que estas células passavam do sangue para o fluido crevicular, e deste para a saliva^{244, 1286}.

Na presente investigação puderam ser identificados, por citometria de fluxo, alguns dos componentes salivares com potencial relevância na resposta imunitária, correlacionando-os com a presença de DM tipo I, a par de um conjunto alargado de outras variáveis. A utilização desta técnica para este tipo de amostra biológica está escassamente descrita na literatura e apresenta algumas condicionantes inerentes, quer ao tratamento da própria amostra (atendendo às suas especificidades físicas e bioquímicas), quer à sensibilidade técnica. Foram efetuadas diferentes correspondências tendo em conta os subgrupos considerados, a multiparametrização analítica das amostras e por base: uma contagem geral de leucócitos CD45+ (número absoluto/10.000 eventos); mononucleares monócitos

CD14+ (% dos CD45+); granulócitos [CD45+CD14-CD3- (número absoluto/10000 eventos)]; mononucleares linfócitos (número absoluto/10.000 eventos) e algumas das suas subpopulações selecionadas - LT CD3+ (% dos linfócitos), LT helper CD4+ e LT citotóxicos CD8+ (% dos linfócitos T).

Os CD45+ constituem uma família de glicoproteínas de alto peso molecular expressas na superfície dos leucócitos e seus precursores hematopoiéticos ¹²⁹⁰⁻¹²⁹² cit in ^{1293, 1294}. No caso dos neutrófilos, os CD45+ regulam a resposta quimiotática, sendo paralelamente referido o seu envolvimento em fenómenos de apoptose e de regulação intercelular entre o tipo de resposta imunitária inata e adaptativa ¹²⁹⁴⁻¹²⁹⁶. Persistem, no entanto, muitas questões acerca do papel da imunidade inata no curso da DM tipo 1 ¹²⁹⁷. A análise da população leucocitária tem constituído um meio de avaliação do tipo de resposta imunitária a diferentes níveis, capilar por exemplo, cuja preponderância se sublinha em diversas patologias inflamatórias e suas complicações (como acontece com a DP e na DM) ¹²⁹⁸. Inclusivamente, a “pré-ativação” ou “iniciação” leucocitária parece correlacionar-se com a DM sem que esteja, porém, totalmente esclarecido o mecanismo molecular pelo qual a hiperglicemia poderá culminar nesta mesma ativação, independentemente da assumida preponderância funcional das selectinas ^{1298, 1299}. Algumas publicações apontam para estados de inflamação crónica (traduzidos, entre outros, por um aumento mantido da contagem de leucócitos) como factor de influência no surgimento de complicações na DM tipo 2 ^{1297, 1300, 1301}. Uma das questões principais continua porém a relacionar-se com o contributo relativo da presença de DM *per se* ou, de forma particular, apenas dos estados episódicos de exacerbação hiperglicémica no quadro inflamatório geral destes indivíduos ¹³⁰².

Corroborando apenas parcialmente estes dados respeitantes à quantificação geral dos leucócitos CD45+ (expressa em número absoluto/10.000 eventos) nas amostras salivares em estudo foi possível verificar que as crianças diabéticas apresentaram um número absoluto mais elevado (1198,55±733,29) do que as não diabéticas (802,49±395,97), com ligeira preponderância nas crianças com adequado controlo metabólico da doença (1368,56±951,48). As diferenças foram estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p < 0,0001$) entre o grupo de crianças diabéticas/diabéticas controladas e o das não diabéticas, mais marcadas no grupo das diabéticas/diabéticas controladas. Não se revelaram, no entanto, estatisticamente significativos os resultados obtidos para o grupo das crianças com pior controlo metabólico ou mesmo quando considerado, no geral, o grau de controlo metabólico da doença (teste de correlação, $p = 0,314$) (Mann-Whitney, $p = 0,189$), a sua duração (Mann-Whitney, $p = 0,145$), género (Mann-Whitney, $p = 0,727$) ou a idade das crianças (Mann-Whitney, $p = 0,078$) (“maturidade” do sistema imunitário), fatores eventualmente relevantes na expressão celular.

Os leucócitos acumulam-se nos locais de infeção por *Candida spp.*, o que pode ser determinante na sua expressão ¹³⁰³. As funções dos CD45+ incluem transdução de sinal dos LT e LB e subsequente ativação linfocitária, bem como a adesão celular homotípica das células T ativadas, estando igualmente envolvidos nos fenómenos de apoptose ^{1290, 1292, 1293 6204, 1296}. No presente estudo verificou-se existirem diferenças estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p = 0,018$) apenas na subpopulação salivar de CD45+ entre os grupos definidos pelo tipo de leveduras na saliva, sendo o CD45+ superior no grupo que apresenta uma predominância de *C. albicans* em detrimento de outras espécies.

Escassas referências fazem menção aos PMN enquanto população leucocitária predominante (cerca de 90%) na saliva estimulada ou fluido crevicular, cabendo aos mononucleares uma percentagem

inferior a 10%; um dos métodos descritos assenta na suposição de que todos os eventos CD45+ fora da *gate* de células mononucleares representam PMN, com base no perfil de distribuição de acordo com o parâmetro *side scatter* (dispersão lateral) que reflete a granulocidade celular^{242, 1282, 1304} *cit in* ¹²⁸⁰. Quanto às células mononucleares, quando calculadas enquanto percentagem (parcial) de todos os eventos CD45+, Vidovic *et al.* em 2012 descrevem como mais frequentes os monócitos (CD14+), seguidos pelos LT (CD3+) e LB (CD20+) referindo, a este propósito, o papel de destaque assumido pelos monócitos na vanguarda do desencadear da resposta imune¹²⁸⁰.

Os PMN neutrófilos, que constituem destacadamente o componente celular principal dos granulócitos, desempenham uma função especialmente importante na resposta inflamatória do hospedeiro contra a infecção, estando demonstrado que a atividade quimiotática pode ser significativamente menor nos diabéticos comparativamente aos saudáveis; de forma semelhante poderão estar afectadas, por influência da produção de polióis, as componentes fagocíticas e microbicidas no geral, a ação enzimática e a produção das espécies reativas de oxigénio, com referência para o facto de uma redução dos níveis de glicemia por ação terapêutica da insulina resultar numa melhoria da capacidade de fagocitose por parte dos neutrófilos¹³⁰⁵. No presente estudo, puderam verificar-se diferenças estatisticamente significativas entre grupos no referente à população de granulócitos, constatando-se que as crianças diabéticas, e mais particularmente as diabéticas controladas, apresentaram níveis salivares mais marcados.

Vidovic, 2012 e Dos-Santos *et al.* em 2009 procederam à análise, igualmente por citometria de fluxo, da percentagem média de LT na saliva total estimulada e não estimulada, respectivamente; os valores obtidos diferiram no sentido das amostras de saliva não estimulada conterem uma percentagem mais elevada do que a saliva estimulada, atribuindo-se estas diferenças ao tipo de colheita e a diferentes técnicas de processamento, aquisição e análise a que foram submetidas (filtração, por exemplo)^{1280, 1306}. A este propósito é porém exposto por Raeste, 1972 não existirem diferenças na contagem celular (ainda que referindo-se a leucócitos) com a variação da técnica de colheita (com ou sem estimulação)¹²⁸² *cit in* ¹²⁸⁰. Importa sublinhar que a análise do conteúdo celular da saliva obtida por estimulação encerra algumas vantagens, designadamente a já referida facilidade de colheita e menor conteúdo mucoso, ao contrário do verificado para a saliva não estimulada, na qual também se verifica a presença de grandes células epiteliais e agregados celulares¹²⁸⁰. Complementarmente alguns autores têm tentado quantificar, de forma diferencial e através de critérios morfológicos, leucócitos em amostras obtidas por diferentes técnicas (estimulação salivar, bochecho); os resultados, não unânimes, levantam a questão da capacidade da distinção, sobretudo pelos métodos baseados em microscopia, entre linfócitos e PMN leucócitos com degeneração nuclear, conduzindo a uma eventual sobrecontagem de células mononucleares¹²⁸⁰⁻¹²⁸² *cit in* ¹²⁸⁰.

Para além da variação interindividual, a contagem leucocitária salivar pode mesmo diferir, no próprio indivíduo, em diferentes períodos do dia; neste estudo foi efetuada uma medição única, não tornando possível este tipo de extrapolação. Por outro lado, se é referenciada uma passagem constante de leucócitos do sangue para a cavidade oral independentemente de existir inflamação local, outros autores mencionam não existir qualquer correlação, significando que alterações sistémicas das subpopulações de leucócitos podem não ter reflexo na saliva, mantendo-se relativamente estáveis os níveis ao longo de diferentes períodos de medição¹³⁰⁷ *cit in* ¹²⁸⁰.

Na presente investigação, dos leucócitos mononucleares considerados percentualmente em relação a todos os eventos CD45+, os menos frequentes foram os monócitos (CD14+), em detrimento das subpopulações de linfócitos (neste caso analisados apenas os LT e não os LB), com particular destaque para os LT CD3+CD4+, para qualquer um dos subgrupos analisados.

Os CD14+ (expressos pelos monócitos, macrófagos e por vários outros tipos celulares, à exceção das células endoteliais e epiteliais intestinais) desempenham, em solução, um papel fundamental na regulação das reações a componentes bacterianos (sCD14, decisivo na neutralização dos lipopolissacarídeos), não apenas na corrente sanguínea, mas também na cavidade oral, reforçando desta forma a importância de muitos dos constituintes salivares na manutenção da homeostase^{229, 1308, 1309}. São células pioneiras na colonização do local onde é acionada a resposta imune, arrogando um papel particularmente importante na resposta imune inata em superfícies mucosas orais que estão a ser constantemente expostas a vários antígenos²⁰⁶. A este propósito, os resultados obtidos expressam a existência de diferenças estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p=0,001$) na subpopulação salivar de CD14+ entre os grupos definidos pelo tipo de leveduras na saliva (*C. albicans*/outras espécies), sendo a subpopulação de CD14+ mais marcada no grupo que apresenta “outras espécies”. A relação com a idade também se mostrou significativa (Mann-Whitney, $p=0,006$), com percentagens superiores no grupo de crianças mais novas; a influência da idade tem sido já descrita na relação com outro tipo de patologias do foro inflamatório, nomeadamente pela envolvimento dos sCD14 na resposta imune inata¹³¹⁰. Bergandi *et al.* em 2007 sugeriram, inclusivamente, que o desaparecimento de sCD14 da saliva poderia vir a ser usado como uma medida da atividade da cárie dentária; nesta amostra em estudo não foi, no entanto, estatisticamente significativa a sua correlação com os índices CPO e cpo (Mann-Whitney, $p=0,130$ e $p=0,559$, respetivamente).

Relativamente à contagem de linfócitos de acordo com a condição não diabético ($118,76\pm 52,14$) e diabético ($123,82\pm 94,23$) não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos ou subgrupos, apesar da marcada variabilidade (a avaliar pelos respetivos desvios-padrão). A análise destes parâmetros linfocitários, essencialmente descritiva, deve assumir-se como uma possibilidade de aferir a “qualidade” da amostra, uma vez que não foi possível, na bibliografia consultada, encontrar qualquer menção para valores padrão para a saliva, referindo-se a quase totalidade das publicações a valores plasmáticos. As subpopulações celulares foram, no entanto, de forma preferencial, avaliadas percentualmente neste trabalho, opção que assentou em alguns pressupostos, particularmente no facto da contagem absoluta de linfócitos apresentar maior variabilidade e grau de erro, o que não é tão observado quando considerados valores percentuais relativos às subpopulações; estes constituem parâmetros mais estáveis do que variações na contagem absoluta para avaliação, por exemplo, da progressão de diferentes patologias (usado de forma particular para o caso de HIV+)^{1311, 1312}. Há que ter em conta que, neste tipo de avaliação, as flutuações transitórias podem surgir devido a doenças intercorrentes leves, imunizações e métodos laboratoriais.

A possibilidade de ocorrência de leucocitose nos pacientes diabéticos parece não se aplicar, de forma transversal, especificamente no caso dos linfócitos, traduzindo as restantes alterações no sistema imunitário a eventual ocorrência acrescida de processos infecciosos perante inadequado controlo metabólico da doença¹³¹³⁻¹³¹⁶ *cit in* ¹³¹³. Uma diminuição plasmática do número de linfócitos pode ser, com alguma probabilidade, uma consequência clínica da ocorrência de apoptose; uma linfopenia T parece

preceder a DM tipo I, acompanhada de um concomitante distúrbio em termos funcionais^{1317-1320, 1321, 1322}. Desta forma poder-se-á conduzir à proposição que o descontrolo metabólico da DM se relaciona com a população linfocitária, na base do qual estarão igualmente mecanismos que envolvem a expressão genética e mitocondrial¹³¹³. Neste estudo, no entanto, os resultados obtidos apenas permitiram constatar a existência, especificamente em relação à subpopulação de LT (CD3+) (“fração” da população total de linfócitos), de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de diabéticos e não diabéticos (Mann-Whitney, $p=0,023$), bem como diabéticos controlados e não diabéticos (Mann-Whitney, $p=0,048$), em ambos os casos com maior acentuação salivar no grupo dos diabéticos. Esta subpopulação aparentou também sofrer influência da duração da DM, com diferenças estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p=0,029$) entre os grupos definidos pela duração da DM, sendo superior no grupo cuja duração da doença era inferior a 5 anos.

Embora se coloquem diversas hipóteses, as mais discutidas assumem o carácter autoimune da DM tipo I com marcada mediação linfocitária, para além da predisposição genética e fatores ambientais, pré-requisitos igualmente importantes; as células β secretoras de insulina são alvo de destruição autoimune por LT e resposta humoral subsequente, resultando em deficiência de insulina e desregulação do metabolismo da glucose^{88, 1323-1325}. Nestes pacientes as alterações nas subpopulações linfocitárias têm sido descritas através dos resultados de análises plasmáticas e, durante décadas, a causa da DM tipo I foi maioritariamente atribuída às células T auto-reativas, particularmente os LT CD4+ e, mais recentemente, os LT CD8+ e os macrófagos^{78, 81, 90, 97, 1326, 1327}. O *ratio* CD4+/CD8+ assume uma relevância controversa, quer para a DM tipo I, quer para outras doenças do foro autoimune: um aumento da proporção de células CD4+ e/ou uma proporção menor de células CD8+ têm sido relatados¹³²⁸⁻¹³³⁰ *cit in* ¹³³¹⁻¹³³⁴. Outros estudos demonstram ainda que no momento do diagnóstico os pacientes com DM tipo I apresentam um incremento do número de linfócitos co-expressando CD45RA e CD45RO (*naïve* e memória), reafirmando que perturbações na normalidade dos processos que regulam a ativação e maturação dos LT representam um importante contributo na patogénese da DM tipo I¹³³⁵⁻¹³³⁷. As implicações funcionais dessas perturbações não foram ainda totalmente conhecidas, constituindo a heterogeneidade da doença uma das razões apontadas¹³³¹. Nesta amostra, em termos percentuais, os LT CD4+ apresentaram um valor mais elevado do que os LT CD8+ em qualquer dos subgrupos analisados, ainda que com alguma supremacia para os diabéticos controlados ($32,00 \pm 17,38$). No caso dos LT CD8+ a percentagem rondou os 10% quer se tratasse de crianças diabéticas ou não diabéticas. Em relação ao cálculo do *ratio* CD4+/CD8+, as crianças não diabéticas obtiveram o valor mais baixo (3,30) e as diabéticas com adequado controlo metabólico o valor mais elevado (6,55), ressalvando-se uma vez mais os elevados valores de dp. A análise dos resultados obtidos permitiu igualmente verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas na subpopulação celular salivar de CD4+ entre o grupo de diabéticos e não diabéticos (superior no grupo dos diabéticos)(Mann-Whitney, $p=0,007$) e, paralelamente, diabéticos controlados e não controlados (Mann-Whitney, $p=0,002$) e diabéticos controlados e não diabéticos (Mann-Whitney, $p=0,002$), corroborando alguns dos resultados acima descritos para o plasma (e não especificamente para a saliva). Pode ainda constatar-se uma correlação no limiar da significância estatística (Coeficiente de Spearman= $-0,235$, $p=0,007$) entre a subpopulação celular salivar de CD4+ e o controlo metabólico da DM tipo I, o mesmo não se verificando relativamente aos CD8+.

Enquanto a maioria dos estudos se tem centrado nas subpopulações de LT nos tecidos periodontais comprometidos e sangue periférico, o potencial de influência dos fatores idade e de gênero carece de caracterização ¹¹⁹². Assim, a idade, o gênero, a frequência de escovagem dentária e a taxa de fluxo ou capacidade tampão salivares foram igualmente analisados nesta investigação, não se verificando qualquer relevância estatística em relação à percentagem das subpopulações salivares de LT CD4+ e CD8+.

Os fagócitos providenciam, depois da saliva, a segunda linha anti-invasão e colonização por *C. albicans*, com os neutrófilos em predominância na fase aguda ^{310, 313, 1209, 1338}. Na maximização da atividade fungicida dos macrófagos e granulócitos, para além dos mecanismos oxidativos e não oxidativos, torna-se fundamental o papel de vários tipos de citocinas produzidas pelas células T ^{1209, 1339, 1340}. Ao nível da mucosa oral não está claramente definido o mecanismo de manutenção da tolerância e qual o papel regulador das células T, ainda que seja referida uma acentuação das células T CD4+ em comparação com as T CD8+ ¹⁹⁹. O estabelecimento deste tipo de imunidade em crianças é “tempo-dependente”, iniciando-se ainda em período pré-uterino e, não obstante a imaturidade anatómica e funcional a par de alguma disparidade ou ausência de total concertação entre as respostas do tipo inata/adaptativa, as crianças demonstram, no geral, um grau suficiente de “competência” imunitária ¹³⁴¹. De forma mais concreta, do tipo de mucosa em causa dependerá o tipo de elementos envolvidos; na cavidade oral, a preponderância dos LT CD4+ traduz-se numa ação protetora importante, ação esta mediada pela produção de IL-17 pelas células Th17, essenciais na prevenção da transição para fenótipos invasivos (vários estudos em curso) ^{308, 409, 1209, 1342, 1343}. Esta ideia é reforçada pela elevada incidência de candidíase orofaríngea em pacientes infetados por HIV com redução de CD4+ ^{348, 1343, 1344}.

Muito embora a imunidade mediada por células T CD4+ da subpopulação Th1 seja considerada o mecanismo de defesa predominante nas infeções orais por *Candida spp.*, outro tipo de mecanismos, orais ou sistémicos, são críticos quando as células T CD4+ se reduzem no plasma abaixo do limiar de proteção. Estabelecendo um paralelo, talvez seja por esta mesma razão que o perfil salivar de citocinas poderá influenciar a resistência ou suscetibilidade a candidíase. Nestas infeções, contudo, os LT CD8+ acumulam-se na interface epitélio-lâmina própria sugerindo-se, nestes casos, a existência de uma disfunção, não apenas neste tipo de células mas, inclusivamente, no ambiente oral envolvente ³¹⁶. No contexto, diferenças estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p=0,026$) puderam ser descritas na subpopulação de CD8+ quando considerados os grupos definidos pela presença de leveduras na mucosa, constatando-se ainda uma correlação significativa, pouco marcada (Coeficiente de Spearman= $-0,149$, $p=0,035$) entre a carga de leveduras na mucosa e a subpopulação celular salivar de CD8+.

Para além das patologias ao nível dos tecidos periodontais, cárie dentária, alterações salivares e episódios infecciosos, já desenvolvidos ao longo deste trabalho, é conjuntamente mencionada na literatura a presença de outro tipo de manifestações orais cuja ocorrência é descrita como baixa e pontualmente exacerbada sob influência hipotética do grau de controlo metabólico ^{556, 1345, 357, 539, 593, 620, 629}. Algumas das modificações a nível salivar, nomeadamente a redução da sua produção e variações de composição, para além das alterações microvasculares contribuem no aparecimento de estomatite, ulcerações, queilite e língua fissurada ou geográfica ^{562, 641, 1070} cit in ^{738, 1071, 1346}. As alterações microvasculares, com implicações a nível dos tecidos orais, moles e duros, podem ainda predispor a estados inflamatórios e infecciosos de maior gravidade ^{52, 1347-1349}. No exame oral das crianças deste estudo verificou-se, no entanto, uma baixa

ocorrência de outro tipo de lesões orais, designadas genericamente de “outras patologias”. Foram registadas pontualmente lesões aftosas simples, fístulas, abscessos, pigmentação negra extrínseca, língua geográfica e defeitos na formação de esmalte. Pode, ainda assim, globalmente ser verificada uma probabilidade acrescida das crianças diabéticas apresentarem este tipo de manifestações em relação às não diabéticas [Chi-quadrado, $p=0,034$; OR=3,173, IC95%(1,038;9,695)]. Também o factor “idade da 1ª consulta de Medicina Dentária” assumiu relevância neste aspecto, verificando-se, de forma previsível, que os pacientes consultados em idades mais precoces apresentavam menos frequentemente “outras patologias” [Chi-quadrado, $p=0,002$; OR=5,780, IC95% (1,661;20,00)].

4.2 Avaliação crítica da metodologia de estudo

Neste tipo de estudo há desde logo a ter em conta que, pelo seu desenho e cronologia foi possível estabelecer medidas de associação ou correlação, mas não relações de causa-efeito entre variáveis. Por outro lado, os resultados obtidos no grupo de crianças diabéticas tipo I (seguidas na respetiva consulta de especialidade), apesar de considerados representativos regionalmente, podem não refletir na íntegra todas as características das crianças diabéticas tipo I portuguesas, exigindo-se para esta generalização “nacional” um aumento da dimensão da amostra.

Algumas das diferenças de resultados relativamente a outras publicações podem ser inerentes, por exemplo, a discrepâncias relacionadas com particularidades do estudo ou modelo diagnóstico, número, localização geográfica, idade e raça das crianças^{337, 409, 413, 414, 433, 742, 776}.

Também a determinação, num período único, de vários dos parâmetros avaliados (como o fluxo salivar estimulado, hemoglobina glicosilada, a concentração salivar dos diversos metabolitos e marcadores inflamatórios) poderá não reproduzir, de forma integral, a dinâmica do verdadeiro estado de saúde oral/geral da criança⁴²¹. Contudo, no caso particular da hemoglobina glicosilada parece verificar-se uma boa correlação entre os valores de HbA_{1c} média e os apresentados na última consulta (medição e registo) (dados não publicados).

Na análise dos resultados de prevalência da cárie dentária há que atender ao facto de a respetiva taxa não permitir retirar com exatidão ilações acerca da extensão ou gravidade da doença (facto também verificado noutras patologias); o cálculo e consideração de valores de mediana teria sido eventualmente mais indicado e correto na avaliação de determinados parâmetros do que o cálculo estrito da média, ainda que o objetivo último seja poder concluir corretamente tendo por base os resultados obtidos. Também em relação as índices cpo e CPO se deve salientar o seu carácter cumulativo e irreversível que espelha lesões de cárie dentária e respetiva abordagem terapêutica, nos quais todos os componentes assumem a mesma ponderação para o cálculo, não refletindo porém a atividade e gravidade da doença. Posto isto reconhece-se, concretamente em relação à avaliação de cárie dentária, a necessidade de, para além da discriminação dos diferentes componentes destes mesmos índices, utilizar indicadores de atividade mais sensíveis combinando, se possível, modelos de desmineralização/remineralização *in vivo* com outro tipo de indicadores (salivares, por exemplo)⁴⁰². Não foram, no presente estudo, igualmente determinadas hipotéticas alterações de composição química salivar, com inequívoca relevância nos mecanismos etiológicos, quer da cárie dentária, quer de outros processos infecciosos e inflamatórios da cavidade oral^{664, 687, 946}.

Apesar das claras vantagens na aplicação dos critérios do ICDAS-II relativamente aos preconizados anteriormente pela OMS em 1997, não deve ser ignorado um aumento nos custos da sua implementação, perda de alguma consistência, reprodutibilidade e poder discriminatório dos resultados (sobretudo nos estudos de secção cruzada)^{479, 490}. Paralelamente, a inclusão de estádios de lesões de cárie que obrigam a um diagnóstico precoce de significativa exigência técnica poderá diminuir o grau de fiabilidade, pela exigência e necessidade de maior dispêndio de tempo para execução do exame oral^{482, 489, 490}. Não deixa, porém, de ser necessário ter em conta que nem sempre a existência de lesão implica um tratamento “efetivo”, quer porque essas lesões, embora presentes, não se encontrem obrigatoriamente ativas, quer porque poderão, inclusivamente, ter capacidade de remineralização

espontânea. Nem tudo será vantajoso neste tipo de opção diagnóstica, a menos que haja garantia de que será possível dar a resposta exigida, seja a mesma baseada numa intervenção imediata ou monitorização.

Também o recurso a radiografias não constitui prática comum em levantamentos epidemiológicos de cárie dentária (particularmente em crianças), ainda que possa contribuir para um aumento na precisão diagnóstica, sobretudo no caso de lesões interproximais; a ausência de um exame radiográfico, conforme ocorreu neste estudo, poderá acarretar uma redução na avaliação da prevalência “real” da doença¹³⁵⁰⁻¹³⁵².

Em relação à comparação de valores há que atender a que as crianças dos dois grupos (diabéticas e não diabéticas) foram observadas em locais diferentes, ponderando-se algum grau de viés relativamente à precisão diagnóstica. Surge ainda a questão de, idealmente, as superfícies dentárias a observar estarem livres de placa e resíduos alimentares por forma a não condicionar a perfeita inspeção das mesmas; não foi efetuada qualquer escovagem dentária prévia por não existirem, alegadamente, condições físicas para que tal fosse cumprido por todas as crianças. Esta “preparação” superficial prévia pode ser considerada um ponto fundamental na utilização dos critérios do ICDAS-II, sobretudo para as lesões em estádios muito iniciais (D_1 - D_2), não sendo expectáveis grandes diferenças de detecção a partir destes níveis⁴⁸³. Foi, porém, dada indicação para que não existisse ingestão de qualquer alimento 60-120 min previamente à observação e colheita salivar, tendo as superfícies dentárias sido apenas “limpas” com os meios disponíveis (ver II, 2.3.1).

No que concerne à análise da condição periodontal de crianças pode ser importante avaliar as alterações periodontais, não apenas ao nível gengival, mas atender ainda eventualmente a perdas de inserção e/ou ósseas (menos frequentes), avaliação essa não realizada neste estudo. O principal problema deriva da inexistência de consenso relativo à extensão ou gravidade de destruição dos tecidos periodontais necessária para que seja considerada clinicamente significativa nestas idades precoces. Ainda a este propósito, não foram efectuados neste estudo registos referentes aos índices de placa, o que poderia ter complementado a caracterização da condição periodontal; limitações de ordem logística (espaço físico e calendarização/condicionantes de horário das consultas de Endocrinologia Pediátrica) estiveram na base desta impossibilidade.

Especificamente em relação à caracterização microbiológica vários fatores poderão ter condicionado os resultados, eminentemente relacionados com diferenças na colheita, preservação e contagem de colónias, para além de algum grau de possível contaminação das amostras, conforme já oportunamente referido. No que concerne a algumas questões metodológicas, há referências que apontam a técnica de “bochecho” como método de eleição, tendo em conta a sensibilidade demonstrada comparativamente a outras técnicas; no entanto, pode existir alguma dificuldade na adopção desta metodologia, sobretudo tratando-se de crianças pequenas com alguma incapacidade em bochechar sem deglutir^{337, 429, 433, 742}.

Na análise metabólica e imunológica a seleção correta da amostra, o cumprimento das técnicas de colheita, o tempo diminuto de armazenamento (ainda que a baixas temperaturas ou em azoto líquido antes do processamento das amostras salivares), a par da conservação adequada sem sujeição a períodos alternados de congelamento/descongelamento, incrementaram a consistência metodológica^{872, 872, 1241}. No entanto, a multiplicidade de passos exigidos desde a obtenção destas amostras até ao seu integral tratamento e análise poderá ter introduzido algum grau de enviesamento

nos resultados. Conforme mencionado por Sugimoto, 2010 há que ter em conta que os perfis dos metabolitos salivares, à semelhança dos perfis genómicos, proteómicos e transcriptómicos, podem flutuar em resposta a condições sistémicas ou orais pelo que é exigida, também por este motivo, a verificação integral da reprodutibilidade do protocolo de recolha e tratamento das amostras ⁸⁷⁵.

Se uma avaliação isolada e única de qualquer um dos parâmetros em estudo deve ser considerada com algum grau de reserva perante a tendência de generalização, a complexidade dos sistemas biológicos e a possibilidade efetiva de ocorrência de falsos positivos e falsos negativos não podem ser menosprezados. Permanece, pois, até à data, e particularmente em relação à saliva, a necessidade de ser tecnicamente possível uma caracterização multiparamétrica global de estados fisiológicos ou patológicos incorrendo num grau mínimo de erro e viabilizando extrapolações entre condições locais e sistémicas (e vice-versa) ⁸⁷⁶.

5. Conclusões

As conclusões foram estruturadas de acordo com as “questões chave” formuladas no capítulo “Introdução e Objetivos”.

Questão I: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações de saúde oral?

No agravamento dos parâmetros periodontais avaliados na amostra de crianças em estudo foi significativa a presença de DM, mas não o seu grau de controlo metabólico ou duração; fatores como a presença de má oclusão, aumento da idade e da subpopulação salivar de CD3+, a par de hábitos de higiene oral menos frequentes, mostraram-se igualmente relevantes. A experiência de cárie dentária tendeu a ser superior nos não diabéticos (40,3% dos não diabéticos e 13,5% dos diabéticos revelaram experiência de cárie em ambas as dentições e os valores obtidos no cálculo dos índices cpo /CPO foram tendencialmente mais elevados nas crianças não diabéticas). Aos 6 anos o CPO de 0,00 (quer no grupo dos não diabéticos quer no dos diabéticos) contrastou com um aumento acentuado nas crianças de 12 anos de ambos os grupos, ainda que mais elevado nas não diabéticas; a única exceção foi verificada no grupo dos 15 anos, em que o CPO e índice SiC dos diabéticos se constatou serem ligeiramente superiores, particularmente nos de pior controlo metabólico. A influência da presença de DM foi mais marcada no índice cpo e o grau de controlo metabólico no CPO, particularmente no respeitante às metabolicamente não controladas, ainda que sem qualquer relevância da duração da doença. As crianças mais novas apresentaram valores mais elevados de cpo e mais baixos de CPO. Outros fatores, tais como o género e frequência diária de ingestão alimentar demonstraram alguma relevância, ainda que apenas no índice cpo, mais elevado nos rapazes e nas crianças com menor frequência de ingestão alimentar. Também na avaliação da ocorrência de outro tipo de lesões orais (que não cárie dentária ou patologia periodontal), mesmo que globalmente pouco prevalentes nesta amostra, é de destacar a probabilidade de ocorrência cerca de 3 vezes superior verificada nas crianças diabéticas relativamente às não diabéticas saudáveis.

Em síntese, a presença de DM tipo I nas crianças está associada a alterações de alguns dos parâmetros de saúde oral, verificando-se um tendencial agravamento da condição periodontal, do índice CPO (particularmente nas crianças mais velhas e com inadequado controlo metabólico da doença).

Questão 2: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros microbiológicos orais?

A resposta a esta questão assenta nos resultados, quer da caracterização bacteriológica da saliva, quer da colonização por leveduras na saliva e esfregaço de mucosa oral.

Na carga bacteriana salivar não se mostrou influente a presença de DM, embora as crianças diabéticas com adequado controlo glicémico tenham tendencialmente apresentado uma menor carga salivar de *S. mutans* e *Lactobacillus* do que as não diabéticas saudáveis. Fatores como a frequência dos hábitos de higiene oral, o consumo de alimentos açucarados, a capacidade tampão salivar, a carga de leveduras, o género e a concentração salivar de lactato mostraram ser significativos. As concentrações salivares de *S. mutans* e *Lactobacillus* foram transversal e relevantemente associadas a índices de cárie mais elevados (CPO e cpo), independentemente da presença ou ausência de DM

A grande maioria das crianças em estudo apresentava a sua cavidade oral colonizada por leveduras, numa percentagem ligeiramente aumentada nos diabéticos, independentemente do controlo metabólico tendo, quer na saliva, quer na mucosa, sido mais marcada a ausência de leveduras nas crianças com valores mais baixos de HbA_{1c}, ainda que com valores algo próximos dos referentes às não diabéticas e diabéticas com inadequado controlo glicémico. Em termos de carga, os diabéticos apresentaram valores médios superiores aos não diabéticos. A espécie mais frequentemente isolada na totalidade da amostra foi a *C. albicans*, verificando-se ser a saliva a amostra biológica a apresentar maior biodiversidade (um total de 11 espécies diferentes de leveduras vs 6 espécies na mucosa). Esta marcada biodiversidade salivar foi significativamente superior nos não diabéticos, nas crianças com residência urbana e nas que não possuíam hábitos de higiene oral diários. Sendo a *C. albicans* a espécie transversalmente mais prevalente na saliva foi perceptível que as crianças diabéticas, e particularmente as não controladas metabolicamente, apresentaram com maior frequência esta espécie (relativamente a outras espécies também identificadas) na relação direta da respectiva carga (menor carga de leveduras, menor frequência *C. albicans*). Paralelamente, e atendendo à relevância dos fatores imunológicos tendo por base a prevalência de *C. albicans* vs não *Candida* e não *albicans* foram constatadas alterações em algumas das subpopulações celulares inflamatórias salivares, designadamente CD45+, CD14+ e CD8+. Na carga e presença de leveduras na mucosa verificou-se uma acentuação da subpopulação salivar de CD8+ e das concentrações salivares de propionato, etanol, acetato e formato, sem qualquer relevância relacionada com a presença de DM, do seu grau de controlo metabólico ou duração. Em termos de biodiversidade na mucosa, e à semelhança do verificado para a saliva, a *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada, sendo esta mesma biodiversidade significativamente superior nos não diabéticos saudáveis, constituindo o género e o período de duração da DM (no grupo dos diabéticos) fatores decisivos

Desta forma pode globalmente concluir-se que a presença de DM tipo I nas crianças não parece estar significativamente associada a alterações dos parâmetros microbiológicos orais.

Questão 3: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações do perfil metabólico salivar?

A presença de DM foi significativa em determinados parâmetros constantes dos perfis metabólicos salivares obtidos, verificando-se algumas diferenças na análise dos mesmos com destaque, nas crianças diabéticas, para um acréscimo da concentração de butirato, por oposição às não diabéticas saudáveis, com concentrações salivares significativamente mais elevadas de alanina, etanol e malato. A idade e o género demonstraram ser particularmente relevantes nas concentrações salivares de alanina e butirato. Contrariamente ao expectável atendendo ao conjunto de processos catabólicos que ocorrem na cavidade oral, não existiram quaisquer diferenças ou associações significativas relativamente aos restantes metabolitos identificados com maior destaque - lactato, formato, propionato e acetato.

Por conseguinte, parecem existir algumas diferenças pontuais no perfil metabólico entre diabéticos e não diabéticos, com particular relevo para o aumento de concentração de butirato nos diabéticos e de malato, etanol e alanina nos não diabéticos.

Questão 4: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros imunoinflamatórios salivares?

O facto dos diabéticos/diabéticos metabolicamente controlados apresentarem níveis mais elevados de CD45+, granulócitos, CD3+ e CD4+ na saliva, e perante um aumento da duração se verificar um aumento de CD3+, leva a concluir que a presença de DM tipo I nas crianças poderá estar relacionada, com maior ou menor relevância, com alterações de alguns parâmetros imunoinflamatórios salivares.

Questão 5: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos potenciais fatores de risco ambientais/comportamentais e/ou fisiológicos para o desenvolvimento de patologia oral?

A este propósito pode concluir-se que um nível de formação superior dos pais das crianças diabéticas exerce uma influência efetiva, traduzida numa melhoria do controlo metabólico da DM. Paralelamente, nas crianças diabéticas constatou-se uma tendência significativa para uma maior frequência diária de ingestão alimentar, ainda que com menor consumo de alimentos açucarados. Também na avaliação do fluxo e capacidade tampão salivares, do acesso à consulta de Medicina Dentária e submissão a tratamentos preventivos e, embora não resultando aqui em diferenças estatisticamente significativas entre grupos, tendo por base a etiopatogenia da grande maioria das doenças orais, devem continuar a ser relevantemente ponderados.

Este estudo permitiu, através da análise dos resultados obtidos, indiciar uma série de implicações clínicas da DM tipo I na cavidade oral, algumas já descritas e outras ainda pouco abordadas na literatura. Desta forma, é aqui uma vez mais reafirmada a oportunidade do Médico Dentista contribuir significativamente, de forma direta, para a melhoria da saúde e qualidade de vida das crianças diabéticas, sublinhando-se a importância da detecção precoce da doença, das suas manifestações orais, monitorização dos níveis de glicemia, aconselhamento nutricional e colaboração interdisciplinar rigorosa e permanente. As técnicas descritas e aplicadas objectivando a caracterização multiparamétrica de aspectos relacionados com a saúde oral destas crianças constituem instrumentos promissores, e a sua aplicação conjugada (pioneira, no que foi possível apurar), em amostras mais extensas e com um período de monitorização mais alargado permitirá, por certo, a clarificação de muitas das questões ainda atualmente por solucionar.

Perspectivas futuras

III – Perspectivas futuras

A DM tipo I elenca uma das principais “inquietudes” clínicas em todo o mundo, particularmente pelo facto de se caracterizar nas crianças mais pequenas por um início mais rápido, menor função das células β pancreáticas residuais e menor taxa de remissão parcial comparativamente a crianças mais velhas. Apesar do acréscimo de conhecimento verificado desde a descoberta da insulina, a clarificação completa da sua etiologia continua a ocupar a comunidade científica, constituindo a terapêutica, até há relativamente pouco tempo atrás, o principal objetivo de gestão clínica, focando-se atual e tendencialmente também nos aspectos de prevenção e potencial cura. Com a prossecução de inúmeras linhas de investigação foi-se tomando aparente que a iniciação e progressão da doença envolvem, provavelmente, a interação de uma multiplicidade de fatores hereditários e imunológicos na dependência de fatores ambientais, alterando posteriormente as vias metabólicas e culminando em complicações mais ou menos generalizadas. Áreas férteis para futuras pesquisas incluem, portanto, inevitavelmente, domínios tão diversos quanto a genética e a imunologia aos níveis celular e molecular, condicionantes das manifestações da DM inclusive na cavidade oral, região anatómica ainda relativamente pouco explorada neste campo de potencialidades.

Anteriormente a maioria dos estudos experimentais para identificação, quer da própria doença, quer das soluções terapêuticas, basearam-se em estudos animais; no entanto, a era atual da nanotecnologia poderá certamente representar uma melhoria significativa na capacidade de diagnóstico da DM e identificação de indivíduos de mais elevada susceptibilidade ou risco. Assim, de futuro, a consideração de tais tecnologias, incluindo a metabolómica e mapeamento genético, poderá contribuir para a detecção precoce, com todas as vantagens que lhe são inerentes.

O campo de diagnóstico salivar é bastante recente, não obstante um número gradual de estudos tenha vindo a ser publicado sobre o tema. O seu estado emergente é evidente na medida em que muitos dos analitos têm vindo a ser pesquisados por um número limitado de investigadores à custa, maioritariamente, de modelos de estudo transversais, resultando na identificação de biomarcadores promissores, peças chave ligadas às distintas fases biológicas da doença. Porém, toda esta informação deve ser entendida no contexto das respectivas vias bioquímicas, devidamente integrada e validada, contribuindo inclusivamente para a monitorização do curso evolutivo da doença.

No que concerne especificamente à patologia oral, e para o caso concreto da cárie dentária e lesões periodontais, também a desejável determinação dos grupos de risco pode sublinhar a necessária realização de estudos longitudinais (incluindo na dentição temporária), igualmente úteis no esclarecimento das relações causais com a DM. Ainda a este nível, nas investigações respeitantes ao biofilme oral, a análise da composição microbiana (o microbioma) constitui, até ao momento, o principal paradigma; no entanto, é reconhecido que as doenças orais, na sua maioria mediadas por microrganismos, não estão apenas dependentes da “simples” presença destes, tornando-se imperativo monitorizar sobretudo a sua atividade metabólica e, conseqüentemente, o seu crescimento e patogenicidade. A análise do metaboloma, capaz de observar as características metabólicas dos biofilmes orais (vias metabólicas e mecanismos reguladores do metabolismo *in vivo*), tem respondido a algumas destas questões, assumindo-se como imperativa a continuação do desenvolvimento de técnicas analíticas

e bancos de dados de metabolitos contribuindo para o esclarecimento da forma como o equilíbrio do biofilme oral é mantido ou se torna patogênico.

Porque as crianças não podem ser consideradas meramente "adultos em ponto pequeno" é adequado ter em linha de conta os aspectos únicos de atendimento e tratamento de crianças e adolescentes com DM tipo I, nomeadamente as alterações na sensibilidade à insulina (inerentes aos processos de crescimento fisiológico geral e maturidade sexual), a vulnerabilidade neurológica particular (na dependência dos estados de hipoglicemia e cetoacidose) e o grau de capacidade no respeito e cumprimento das exigências terapêuticas (inclusivamente em ambiente escolar). Estes constituem pontos essenciais a atentar no desenvolvimento e implementação de um regime ideal de cuidados na DM.

A problemática da educação terapêutica tem granjeado, por esta mesma razão, um acentuado nível de significância para os diferentes profissionais envolvidos nos cuidados a estas crianças, caracterizadas por um elevado "consumo" de serviços de saúde, custos familiares, emocionais e socioeconómicos decorrentes da própria doença e do "ser" e "estar" doente. Esta questão continuará, por certo, a constituir uma preocupação de futuro e na ausência, até à data, de um meio absoluto de prevenção da doença, será requerido um adequado planeamento de serviços e recursos que garanta a exigente resposta face à incidência crescente. A integração obrigatória do Médico Dentista na rede de cuidados da DM constituirá uma enorme mais-valia, porquanto melhorará a percepção dos efeitos da doença, minimizará a gravidade das possíveis manifestações clínicas orais e introduzirá, por certo, melhorias significativas no respeitante à qualidade de vida destas crianças.

Resumo

IV – Resumo

Introdução: A diabetes *mellitus* tipo I (DMI) é uma doença crónica, tendencialmente debilitante, de incidência crescente, que afeta essencialmente crianças e jovens adultos. Fatores genéticos e ambientais parecem constituir a sua base etiológica multifactorial, igualmente caracterizada pela destruição autoimune das células β pancreáticas produtoras de insulina permanecendo, no entanto, muitos dos mecanismos envolvidos por esclarecer. A DMI e a saúde oral relacionam-se estrita e reciprocamente, reconhecendo-se nos pacientes diabéticos uma maior susceptibilidade a patologias orais de natureza inflamatória, catabólica e crónica, com hipotético impacto particularmente a nível salivar, ainda que sem consenso generalizado. Este trabalho teve como objetivo a identificação de potenciais determinantes da DMI na saúde oral das crianças, particularmente relacionados com parâmetros salivares microbiológicos, imunológicos, metabólicos e comportamentais/ambientais.

Materiais e métodos: Foi efetuado um estudo clínico observacional do tipo analítico e transversal (seccional cruzado) cumprindo os requisitos éticos e legais exigidos. A amostra compôs-se de 133 crianças com DMI e 72 não diabéticas saudáveis, dos 5 aos 15 anos, seguidas nas consultas da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Pediátrico de Coimbra e Odontopediatria do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. As crianças diabéticas foram agrupadas de acordo com os níveis de HbA_{1c}. A avaliação clínica oral foi desempenhada por uma Médica Dentista experiente, sujeita a calibração prévia, contemplando o registo de aspectos comportamentais e relacionados com a higiene oral, patologia oral, taxa de fluxo estimulado, capacidade tampão e carga bacteriana (*S.mutans* e *Lactobacillus*) salivares. Foi igualmente caracterizada a carga e biodiversidade de leveduras na saliva e mucosa, perfis metabólico salivar por ¹H-NMR e imunoinflamatório parcial por citometria de fluxo. Após organização de resultados e categorização de variáveis procedeu-se a análise estatística através do SPSS 19[®] com aplicação dos testes Kruskal-Wallis, χ^2 , Mann-Whitney, t de Student, exato de Fisher, coeficiente de Spearman e *odds ratio*; valores de p <0,05 foram considerados significativos para um IC de 95%.

Resultados: As crianças diabéticas apresentaram valores médios percentuais de HbA_{1c} de 8,19±1,42 e duração média da doença de 5,2±3,4 anos. Um controlo metabólico mais favorável foi significativamente associado a um nível de formação superior dos progenitores e à menor idade. Na avaliação sumária da condição periodontal cerca de 50% das crianças não diabéticas e 70% das diabéticas apresentaram hemorragia à sondagem/cálculos, associada ainda a valores salivares médios mais elevados de CD3+ e aumento da idade. 40,3% dos não diabéticos e 13,5% dos diabéticos revelaram experiência de cárie em ambas as dentições. Os valores dos índices cpo/CPO foram, global e respectivamente: a) amostra total: 2,70±2,42/1,54±1,99; b) não diabéticos: 3,52±2,53/1,91±2,23; c) diabéticos: 1,79±1,90/1,25±1,70. Por idades-índice obteve-se um CPO aos 6/12 e 15 anos, respetivamente, de: a) amostra total: 0,00/4,20±1,92 e 4,00±1,00; b) não diabéticos: 0,00/6,00±1,41 e 5,00±4,00; c) diabéticos: 0,00/3,00±1,00 e 5,74±4,48. O valor do índice SiC aos 12 anos foi de 5,80±1,72. O índice CPO foi significativamente influenciado pelos valores de HbA_{1c}, idade, frequência de escovagem dentária, presença de má oclusão e carga bacteriana salivar, enquanto no cpo a presença de DM, o género, a idade, a carga bacteriana salivar e o número de refeições diárias foram determinantes. Na taxa de secreção e capacidade tampão salivares não houve diferenças estatisticamente significativas entre grupos. Os

diabéticos metabolicamente controlados apresentaram menor carga salivar de *S. mutans* e *Lactobacillus*, ainda que a presença de DM *per se* não se tenha revelado fundamental. Cerca de 60% das crianças (diabéticas/não diabéticas) apresentaram colonização por leveduras positiva, mas apenas 3 destas com manifestações clínicas, estando a ausência de leveduras (na saliva/mucosa) mais marcada (42,4/73,3%) nas crianças com menor HbA_{1c}. A espécie mais frequentemente isolada foi a *C. albicans*. A presença de DM traduziu-se numa maior frequência salivar relativa de *C. albicans* (vs outras espécies) associando-se ainda a presença de leveduras na saliva a maiores concentrações de propionato, alanina, etanol, butirato, acetato e formato. Nas crianças com maior prevalência de *C. albicans* houve acentuação salivar significativa de CD45+, enquanto nas com maior prevalência de “outras espécies” foram mais relevantes os CD14+ e CD8+. A presença de leveduras na mucosa relacionou-se com a subpopulação salivar de CD8+ e aumento da concentração salivar de propionato, etanol, acetato e formato, revelando-se aqui a biodiversidade significativamente superior. Na análise do perfil metabólico salivar destacaram-se as concentrações significativamente acrescidas, nas crianças não diabéticas, de alanina, etanol e malato, enquanto as diabéticas apresentaram níveis mais elevados de butirato. Na caracterização imunoinflamatória constatou-se que as crianças diabéticas apresentaram níveis salivares mais elevados de CD45+, granulócitos, CD3+ e CD4+, constituindo a duração da DM um factor determinante na subpopulação salivar de CD3+, tal como a idade em relação aos CD14+.

Conclusões: Respeitando o âmbito e limitações inerentes à metodologia deste trabalho pode concluir-se que a presença de DM1 nas crianças está associada a alterações de alguns dos parâmetros de saúde oral, metabólicos e imunoinflamatórios da saliva, bem como de alguns fatores de risco ambientais/comportamentais para o desenvolvimento de patologia oral.

Abstract

V – Abstract

Introduction: Type 1 diabetes *mellitus* (T1DM) is a chronic and debilitating increasing disorder that mostly affects children and young adults. Genetic and environmental factors embodies its etiologic basis, also characterized by autoimmune destruction of insulin producing β -cells of the pancreatic islets of Langerhans, although many of its mechanisms still remain unclear. T1DM and oral diseases are closely and bidirectionally related. Diabetic patients are known to express a high predisposition to oral diseases of inflammatory, catabolic and chronic nature with potential impact on salivary status; however there is no consensus regarding these associations. The aim of this work was to assess potential T1DM determinants related to children's oral health status, namely those concerning to salivary, microbiological, immune-inflammatory and behavioural profiles.

Material and methods: A clinical analytical cross-sectional study involving 133, 5 to 15-yr-old, T1DM and 72, age- and gender- matched non-diabetic children, respectively monitored in the Paediatric Endocrinology Unit (Paediatric Hospital of Coimbra) and Paediatric Dentistry (Faculty of Medicine, University of Coimbra), fulfilling the inclusion criteria, was performed. All ethical and legal requirements were fully met. Diabetic children were grouped according to the level of HbA_{1c}. Diabetes-related data were collected from medical records and completed with the lab data on HbA_{1c}. The clinical and analytical evaluation was performed by a calibrated and experienced dentist regarding oral hygiene, oral pathology, stimulated salivary flow rate, salivary buffer capacity, *mutans streptococci* and *lactobacilli* salivary counts. In addition, it was characterized the oral yeast carriage and biodiversity (saliva/mucosa) and also determined both salivary metabolomic profile (by ¹H-NMR) and patterns of salivary immune-inflammatory cellular subpopulations (by flow cytometry). The results were organized and variables properly categorized to be analysed with SPSS 19[®]. Statistical analysis was performed applying the following tests: Kruskal-Wallis, χ^2 , Mann-Whitney, Student's t, Fisher's exact, Spearman coefficient and *odds ratio*. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

Main results: Diabetic children had an HbA_{1c} mean percentage of $8,19 \pm 1,42$ and disease duration of $5,2 \pm 3,4$ years. The degree of metabolic control was significantly associated with educational level of parents and children's lower age. From the assessment of periodontal conditions it can be concluded that approximately 50% of non-diabetic and 70% of diabetic children showed signs of bleeding on probing/calculus, with trend and significant increase in diabetic children, nevertheless the associated salivary higher average values of CD3+ and increased age. 40,3% of non-diabetic and 13,5% of diabetics revealed dental caries in both dentitions. The average dmft/DMFT were respectively: a) total sample: $2,70 \pm 2,42 / 1,54 \pm 1,99$; b) non-diabetic: $3,52 \pm 2,53 / 1,91 \pm 2,23$; c) diabetic: $1,79 \pm 1,90 / 1,25 \pm 1,70$. The results for DMFT at 6/12 years were: a) total sample: $0,00 / 4,20 \pm 1,92$; b) non-diabetics: $0,00 / 6,00 \pm 1,41$; c) diabetics: $0,00 / 3,00 \pm 1,00$; at 15 year –old: $4,00 \pm 1,00$ (total sample); $5,00 \pm 4,00$ (non-diabetic) and $5,74 \pm 4,48$ (diabetic). The SiC index was $5,80 \pm 1,72$ at 12 years. The DMFT index was significantly influenced by higher values of HbA_{1c}, age, frequency of tooth brushing, malocclusion and *mutans streptococci* and *lactobacilli* salivary counts while in dmft the presence of DM, gender, age, higher *mutans streptococci* and *lactobacilli* salivary counts and daily meals frequency were decisive. No statistically significant differences were found in secretion rates and salivary buffer capacity between groups.

Metabolically controlled diabetics had lower *mutans streptococci* and *lactobacilli* salivary counts, although the presence of T1DM itself has not proved to be critical. About 60% of children (diabetic/non-diabetic) showed positive colonization by yeasts although only 3 of these had clinical manifestations, with an accentuated absence of yeast (42,4% saliva/73,3% mucosa) in children with lower values of HbA_{1c}. The most frequently isolated specie was *C. albicans*, The presence of T1DM resulted in a greater prevalence of salivary *C. albicans* (vs. other species), still the presence of yeasts in saliva connected to higher concentrations of propionate, alanine, ethanol, butyrate, acetate and format. Children with higher prevalence of salivary *C. albicans* showed significant accentuation of CD45+ whereas in cases of greater prevalence of "other species" CD14+ and CD8+ were more relevant. The presence of yeasts in oral mucosa was related to CD8+ salivary subpopulation and an increased salivary concentration of propionate, ethanol, acetate and formate, with biodiversity significantly higher in non-diabetics and male gender. By analysis of salivary metabolomics profiles can be noted a significant increase in the concentrations of alanine, ethanol and malate in non-diabetic children, while diabetics exhibited higher levels of butyrate. The immune-inflammatory characterization found that diabetic children also showed higher salivary levels of CD45+, granulocytes, CD3+ and CD4+, with DM's duration being a relevant factor in CD3+ salivary subpopulation, such as age referred to CD14+ cells.

Conclusions: Bearing in mind the goals and limitations of this study's methodology it can be concluded that the presence of T1DM in children is associated with changes in some parameters of oral health, salivary metabolomic and immune-inflammatory profiles, as well as certain environmental and/or behavioural risk factors for oral pathology.

Bibliografía

VI - Bibliografía

1. Miller W. The human mouth as a focus of infection. *The dental cosmos*. 1891;33(9):689-713.
2. Barnett ML. The oral-systemic disease connection. An update for the practicing dentist. *J Am Dent Assoc* 2006;137 Suppl:5S-6S.
3. Lopez NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;73(8):911-24.
4. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347(20):1557-65.
5. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* 2004;83(2):156-60.
6. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, et al. The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: the Hisayama study. *J Dent Res* 2004;83(6):485-90.
7. Wahaidi VY, Dowsett SA, Eckert GJ, Kowolik MJ. Neutrophil response to dental plaque by gender and race. *J Dent Res* 2009;88(8):709-14.
8. Joshipura K, Ritchie C, Douglass C. Strength of evidence linking oral conditions and systemic disease. *Compend Contin Educ Dent Suppl* 2000;30(12-23):quiz 65.
9. Saini R, Saini S, Sugandha R. Periodontal disease: The sixth complication of diabetes. *J Family Community Med* 2011;18(1):31.
10. Kidambi S, Patel SB. Diabetes mellitus: considerations for dentistry. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:8S-18S.
11. Bharateesh J, Ahmed M, Kokila G. Diabetes and Oral Health: A Case-control Study. *Int J Prev Med* 2012;3(11):806-9.
12. Cullinan MP, Ford PJ, Seymour GJ. Periodontal disease and systemic health: current status. *Aust Dent J* 2009;54 Suppl 1:S62-9.
13. Albert DA, Ward A, Allweiss P, Graves DT, Knowler WC, Kunzel C, et al. Diabetes and oral disease: implications for health professionals. *Ann N Y Acad Sci* 2012.
14. Seymour RA. Is oral health a risk for malignant disease? *Dent Update* 2010;37(5):279-80, 82-3.
15. Seymour RA. Is gum disease killing your patient? *Br Dent J* 2009;206(10):551-2.
16. Slots J, Kamma JJ. General health risk of periodontal disease. *Int Dent J* 2001;51(6):417-27.
17. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(4):547-58.
18. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8(1):70-8.
19. Ferguson JE, 2nd, Hansen WF, Novak KF, Novak MJ. Should we treat periodontal disease during gestation to improve pregnancy outcomes? *Clin Obstet Gynecol* 2007;50(2):454-67.
20. Loesche WJ. Periodontal disease: link to cardiovascular disease. *Compend Contin Educ Dent* 2000;21(6):463-6, 68, 70 passim; quiz 84.
21. Loesche WJ. Periodontal infection a risk factor for cardiovascular disease? *Postgrad Med* 2000;107(5):17, 20.
22. Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S. Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol* 2005;76(11 Suppl):2085-8.
23. Rose LF, Steinberg BJ, Minsk L. The relationship between periodontal disease and systemic conditions. *Compend Contin Educ Dent* 2000;21(10A):870-7; quiz 78.
24. Fisher MA, Borgnakke WS, Taylor GW. Periodontal disease as a risk marker in coronary heart disease and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19(6):519-26.
25. Gordon SC, Barasch A, Foong WC, Elgeneidy AK, Safford MM. Does dental disease hurt your heart? *J Can Dent Assoc* 2005;71(2):93-5.
26. Thorat MS, Raju A, Pradeep AR. *Pemphigus vulgaris*: effects on periodontal health. *J Oral Sci* 2010;52(3):449-54.
27. Mirmelees J, Crofford LJ, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson Iii DR, Ebersole JL, et al. Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2010;37(12):1068-74.
28. Fitzpatrick SG, Katz J. The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. *J Dent* 2010;38(2):83-95.
29. Ford PJ, Raphael SL, Cullinan MP, Jenkins AJ, West MJ, Seymour GJ. Why should a doctor be interested in oral disease? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010;8(10):1483-93.
30. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc* 2002;68(3):170-4.
31. Gurav A, Jadhav V. Periodontitis and Risk for Diabetes Mellitus - A Review. *J Diabetes* 2010.
32. Simpson TC, Needleman I, Wild SH, Moles DR, Mills EJ. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;5:CD004714.
33. Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J* 2001;46(1):2-12.
34. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 2007;13 Suppl 4:3-10.
35. Vergnes JN. Treating periodontal disease may improve metabolic control in diabetics. *Evid Based Dent* 2010;11(3):73-4.
36. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* 2001;6(1):99-112.
37. Lalla E, Papananou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(12):738-48.
38. Logan RM. Links between oral and gastrointestinal health. *Curr Opin Support Palliat Care* 2010;4(1):31-5.
39. Summers SA, Tilakaratne WM, Fortune F, Ashman N. Renal disease and the mouth. *Am J Med* 2007;120(7):568-73.
40. Anjomshoa I, Cooper ME, Vieira AR. Caries is Associated with Asthma and Epilepsy. *Eur J Dent* 2009;3(4):297-303.
41. Stensson M, Wendt LK, Koch G, Nilsson M, Oldaeus G, Birkhed D. Oral health in pre-school children with asthma--followed from 3 to 6 years. *Int J Paediatr Dent* 2010;20(3):165-72.
42. Ersin NK, Gulen F, Eronat N, Cogulu D, Demir E, Tanac R, et al. Oral and dental manifestations of young asthmatics related to medication, severity and duration of condition. *Pediatr Int* 2006;48(6):549-54.
43. Gurbuz T, Tan H. Oral health status in epileptic children. *Pediatr Int* 2010;52(2):279-83.
44. Bimstein E, Katz J. Obesity in children: a challenge that pediatric dentistry should not ignore--review of the literature. *J Clin Pediatr Dent* 2009;34(2):103-6.
45. Ayhan H, Suskan E, Yildirim S. The effect of nursing or rampant caries on height, body weight and head circumference. *J Clin Pediatr Dent* 1996;20(3):209-12.
46. Acs G, Ng MW. Early childhood caries and well being. *Pediatr Dent* 2002;24(4):288.
47. Sheiham A. Dental caries affects body weight, growth and quality of life in pre-school children. *Br Dent J* 2006;201(10):625-6.
48. Low W, Tan S, Schwartz S. The effect of severe caries on the quality of life in young children. *Pediatr Dent* 1999;21(6):325-6.
49. WHO. Diabetes Fact Sheet. Geneva: WHO; 2008.

50. Angus VC, Waugh N. Hospital admission patterns subsequent to diagnosis of type I diabetes in children : a systematic review. *BMC Health Serv Res* 2007;7:199.
51. Tharkar S, Devarajan A, Kumpatla S, Viswanathan V. The socioeconomics of diabetes from a developing country: a population based cost of illness study. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;89(3):334-40.
52. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res* 2006;85(1):15-21.
53. Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24(1):8-16.
54. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 1997;68(2):127-35.
55. Lebovitz HE. Etiology and pathogenesis of diabetes mellitus. *Pediatr Clin North Am* 1984;31(3):521-30.
56. Javed F. Oral inflammatory conditions and diabetes mellitus [Stockholm, Sweden: Intitutet of Odontology, Karolinska Institutet; 2008.
57. Gale EA. The rise of childhood type I diabetes in the 20th century. *Diabetes* 2002;51(12):3353-61.
58. Craig ME, Hattersley A, Donaghue KC. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2009;10 Suppl 12:3-12.
59. Bergman SA. Perioperative management of the diabetic patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(6):731-7.
60. Fauci ASB, E. Kasper, D.L. Hauser, S.L. Longo, D.L. Jameson, J.L. Loscalzo, J. Medicina Interna. 17 ed ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2008.
61. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000 2007;44:127-53.
62. Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2010;2:3.
63. Orbak R, Simsek S, Orbak Z, Kavrut F, Colak M. The influence of type-I diabetes mellitus on dentition and oral health in children and adolescents. *Yonsei Med J* 2008;49(3):357-65.
64. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, et al. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;55(1):65-85.
65. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20(7):1183-97.
66. Eisenbarth GS. Update in type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(7):2403-7.
67. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33 Suppl 1:S62-9.
68. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type I diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011;91(1):79-118.
69. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34(6):e61-99.
70. Reaven GM, Chen YD. Role of insulin in regulation of lipoprotein metabolism in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1988;4(7):639-52.
71. Sacks DB, McDonald JM. The pathogenesis of type II diabetes mellitus. A polygenic disease. *Am J Clin Pathol* 1996;105(2):149-56.
72. Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care* 2011;34(6):1249-57.
73. Saraiva JG, L. Carvalheiro, M. Classificação e diagnóstico da diabetes mellitus - o que há de novo em 2010. *Rev Port Diab* 2010;5(2):77-82.
74. Metzger BE. Treatment of mild gestational diabetes mellitus. Is it time for a controlled clinical trial? *Diabetes Care* 1988;11(10):813-6.
75. Coppieters K, von Herrath M. Taking a closer look at the pancreas. *Diabetologia* 2008;51(12):2145-7.
76. Bascones-Martinez A, Matesanz-Perez P, Escribano-Bermejo M, Gonzalez-Moles MA, Bascones-Ilundain J, Meurman JH. Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Sep 1;16(6):e722.
77. Homann D, von Herrath M. Regulatory T cells and type I diabetes. *Clin Immunol* 2004;112(3):202-9.
78. Krip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type I diabetes. *Autoimmun Rev* 2008;7(7):550-7.
79. Markopoulos AK, Belazi MA, Drakoulakos D. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in saliva of children with type I diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1997;38(3):169-72.
80. Gillespie KM. Type I diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ* 2006;175(2):165-70.
81. Phillips JM, Parish NM, Raine T, Bland C, Sawyer Y, De La Pena H, et al. Type I diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. *Rev Diabet Stud* 2009;6(2):97-103.
82. Saxena A, Desbois S, Carrie N, Lawand M, Mars LT, Liblau RS. Tc17 CD8+ T cells potentiate Th1-mediated autoimmune diabetes in a mouse model. *J Immunol* 2012;189(6):3140-9.
83. Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther* 2005;12(6):580-91.
84. Amador-Patarroyo MJ, Rodriguez-Rodriguez A, Montoya-Ortiz G. How does age at onset influence the outcome of autoimmune diseases? *Autoimmune Dis* 2012;2012:251730.
85. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 2000;355(9207):873-6.
86. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med* 1987;166(4):823-32.
87. Mallone R, Martinuzzi E, Blancou P, Novelli G, Afonso G, Dolz M, et al. CD8+ T-cell responses identify beta-cell autoimmunity in human type I diabetes. *Diabetes* 2007;56(3):613-21.
88. Tritt M, Sgouroudis E, d'Hennezel E, Albanese A, Piccinillo CA. Functional waning of naturally occurring CD4+ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes. *Diabetes* 2008;57(1):113-23.
89. Miller BJ, Appel MC, O'Neil JJ, Wicker LS. Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1988;140(1):52-8.
90. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986;314(21):1360-8.
91. Hedman M, Faresjö M, Axelsson S, Ludvigsson J, Casas R. Impaired CD4 and CD8 T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type I diabetic children. *Clin Exp Immunol* 2008;153(3):360-8.
92. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, et al. Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type I diabetes. *J Immunol* 2010;185(7):3814-8.
93. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001;414(6865):792-8.
94. Mallone R, van Endert P. T cells in the pathogenesis of type I diabetes. *Curr Diab Rep* 2008;8(2):101-6.
95. McDevitt HO, Unanue ER. Autoimmune diabetes mellitus--much progress, but many challenges. *Adv Immunol* 2008;100:1-12.
96. Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 1994;43(5):667-75.
97. Faustman DL, Davis M. The primacy of CD8 T lymphocytes in type I diabetes and implications for therapies. *J Mol Med (Berl)* 2009;87(12):1173-8.
98. Seyfert-Margolis V, Gisler TD, Asare AL, Wang RS, Dosch HM, Brooks-Worrell B, et al. Analysis of T-cell assays to measure autoimmune responses in subjects with type I diabetes: results of a blinded controlled study. *Diabetes* 2006;55(9):2588-94.
99. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133(5):775-87.

100. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109(1):131-40.
101. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54(1):92-9.
102. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, et al. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2007;56(3):604-12.
103. Martinuzzi E, Novelli G, Scotto M, Blancou P, Bach JM, Chaillous L, et al. The frequency and immunodominance of islet-specific CD8+ T-cell responses change after type 1 diabetes diagnosis and treatment. *Diabetes* 2008;57(5):1312-20.
104. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol* 2010;185(3):1959-67.
105. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, et al. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol* 2009;183(7):4432-9.
106. Bingley PJ, Williams AJ, Colman PG, Gellert SA, Eisenbarth G, Yu L, et al. Measurement of islet cell antibodies in the Type 1 Diabetes Genetics Consortium: efforts to harmonize procedures among the laboratories. *Clin Trials* 2010;7(1 Suppl):S56-64.
107. Notkins AL, Lemmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 2001;108(9):1247-52.
108. Knip M. Can we predict type 1 diabetes in the general population? *Diabetes Care* 2002;25(3):623-5.
109. Taplin CE, Barker JM. Natural evolution, prediction, and prevention of type 1 diabetes in youth. *Endocr Res* 2008;33(1-2):17-33.
110. Friedrich N. Metabolomics in diabetes research. *J Endocrinol* 2012;215(1):29-42.
111. Polychronakos C, Li Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet* 2011;12(11):781-92.
112. Kimpimaki T, Kupila A, Hamalainen AM, Kukko M, Kulmala P, Savola K, et al. The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4782-8.
113. Graves PM, Rotbart HA, Nix WA, Pallansch MA, Erlich HA, Norris JM, et al. Prospective study of enteroviral infections and development of beta-cell autoimmunity. Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetes Res Clin Pract* 2003;59(1):51-61.
114. Hiltunen M, Hyoty H, Knip M, Ilonen J, Reijonen H, Vahasalo P, et al. Islet cell antibody seroconversion in children is temporally associated with enterovirus infections. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J Infect Dis* 1997;175(3):554-60.
115. Dahlquist G. Environmental risk factors in human type 1 diabetes--an epidemiological perspective. *Diabetes Metab Rev* 1995;11(1):37-46.
116. Hyoty H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vahasalo P, Karjalainen J, et al. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes* 1995;44(6):652-7.
117. Filippi CM, von Herrath MG. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes* 2008;57(11):2863-71.
118. Gale EA. Viruses and type 1 diabetes: ignorance acquires a better vocabulary. *Clin Exp Immunol* 2012;168(1):1-4.
119. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Pihkala P, Ilonen J, Savilahti E. Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52(9):2287-95.
120. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 2003;290(13):1713-20.
121. Atkinson MA, Bowman MA, Kao KJ, Campbell L, Dush PJ, Shah SC, et al. Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1993;329(25):1853-8.
122. Bodington MJ, McNally PG, Burden AC. Cow's milk and type 1 childhood diabetes: no increase in risk. *Diabet Med* 1994;11(7):663-5.
123. Lempainen J, Vaarala O, Makela M, Veijola R, Simell O, Knip M, et al. Interplay between PTPN22 C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2009;33(2):155-64.
124. Harrison LC, Honeyman MC. Cow's milk and type 1 diabetes: the real debate is about mucosal immune function. *Diabetes* 1999;48(8):1501-7.
125. Vaarala O. Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunol Cell Biol* 2012;90(3):271-6.
126. Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA* 2007;298(12):1420-8.
127. Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, Mesquita AC, Fona C, Carvalho R, et al. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabet Med* 2010;27(8):879-81.
128. DGS. Diabetes: factos e números 2010 Portugal - Relatório Anual. In: Diabetes ONd, editor. Lisboa; 2010.
129. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2006. *Diabetes Care* 2006;29 Suppl 1:S4-42.
130. Nadanovsky P, Sheiham A. Relative contribution of dental services to the changes in caries levels of 12-year-old children in 18 industrialized countries in the 1970s and early 1980s. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995;23(6):331-9.
131. Laakso M, Pyorala K. Age of onset and type of diabetes. *Diabetes Care* 1985;8(2):114-7.
132. Levy-Marchal C, Patterson C, Green A. Variation by age group and seasonality at diagnosis of childhood IDDM in Europe. The EURODIAB ACE Study Group. *Diabetologia* 1995;38(7):823-30.
133. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltész G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009;373(9680):2027-33.
134. Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB, Jr., Imperatore G, Johansen JM, Linder B, et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *JAMA* 2007;297(24):2716-24.
135. Maffei C, Pinelli L. Teaching children with diabetes about adequate dietary choices. *Br J Nutr* 2008;99 Suppl 1:S33-9.
136. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 2000;23(10):1516-26.
137. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med* 2006;23(8):857-66.
138. Bougneres P, Valleron AJ. Causes of early-onset type 1 diabetes: toward data-driven environmental approaches. *J Exp Med* 2008;205(13):2953-7.
139. Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, Gill GV, et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet* 2004;364(9446):1699-700.
140. Graves PM, Norris JM, Pallansch MA, Gerling IC, Rewers M. The role of enteroviral infections in the development of IDDM: limitations of current approaches. *Diabetes* 1997;46(2):161-8.
141. Todd JA. A protective role of the environment in the development of type 1 diabetes? *Diabet Med* 1991;8(10):906-10.
142. Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, Plotnick L, Kaufman F, Laffel L, et al. Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005;28(1):186-212.
143. Couper J, Donaghy KC. Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2009;10 Suppl 12:13-6.
144. Bober E, Dunder B, Buyukgebiz A. Partial remission phase and metabolic control in type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(4):435-41.
145. Rayburn WF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: highlights from the American Diabetes Association. *J Reprod Med* 1997;42(9):585-6.

146. Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health* 2008;122(4):417-33.
147. Diabetes and periodontal diseases. Committee on Research, Science and Therapy. American Academy of Periodontology. *J Periodontol* 2000;71(4):664-78.
148. Mealey BL, Rethman MP. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today* 2003;22(4):107-13.
149. Fiske J. Diabetes mellitus and oral care. *Dent Update* 2004;31(4):190-6, 98.
150. Løe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16(1):329-34.
151. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004;346(2):161-70.
152. Coughlan MT, Yap FY, Tong DC, Andrikopoulos S, Gasser A, Thallas-Bonke V, et al. Advanced glycation end products are direct modulators of beta-cell function. *Diabetes* 2011;60(10):2523-32.
153. Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:195-245.
154. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* 1998;3(1):51-61.
155. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol* 1998;3(1):40-50.
156. Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontol Res* 1996;31(7):508-15.
157. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;32 Suppl 1:S62-7.
158. Usher-Smith JA, Thompson MJ, Sharp SJ, Walter FM. Factors associated with the presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes in children and young adults: a systematic review. *BMJ* 2011;343:d4092.
159. Rewers M, Pinoker C, Donaghue K, Hanas R, Swift P, Klingensmith GJ. Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes* 2009;10 Suppl 12:71-81.
160. Virtue MA, Fume JK, Nuttall FQ, Levitt MD. Relationship between GHb concentration and erythrocyte survival determined from breath carbon monoxide concentration. *Diabetes Care* 2004;27(4):931-5.
161. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2002;25(2):275-8.
162. Scott DA, Renaud DE, Krishnasamy S, Meric P, Buduneli N, Cetinkalp S, et al. Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. *Diabetol Metab Syndr* 2010;2:48.
163. Davidson MB, Schriger DL, Peters AL, Lorber B. Glycosylated hemoglobin as a diagnostic test for type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2000;283(5):606-7.
164. Cohen RM, Franco RS, Joiner CH. Is poor glycemic control associated with reduced red blood cell lifespan? *Diabetes Care* 2004;27(4):1013-4.
165. Avignon A, Radauceanu A, Monnier L. Nonfasting plasma glucose is a better marker of diabetic control than fasting plasma glucose in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1997;20(12):1822-6.
166. Hillman N, Herranz L, Grande C, Vaquero PM, Pallardo LF. What is the relative contribution of blood glucose levels at different time points of the day to HbA1c in Type 1 diabetes? *Diabet Med* 2004;21(5):468-70.
167. Diabetes Research in Children Network Study G, Wilson DM, Kollman. Relationship of A1C to glucose concentrations in children with type 1 diabetes: assessments by high-frequency glucose determinations by sensors. *Diabetes Care* 2008;31(3):381-5.
168. Fajans SS, Herman WH, Oral EA. Insufficient sensitivity of hemoglobin A(C) determination in diagnosis or screening of early diabetic states. *Metabolism* 2011;60(1):86-91.
169. Paroni R, Ceriotti F, Galanello R, Battista Leoni G, Panico A, Scurati E, et al. Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma. *Clin Biochem* 2007;40(18):1398-405.
170. Picardi A, Pozzilli P. Dynamic tests in the clinical management of diabetes. *J Endocrinol Invest* 2003;26(7 Suppl):99-106.
171. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009;32(7):1327-34.
172. Federation ID. Global IDF/ISPAD Guideline for Diabetes in childhood and adolescence Brussels: IDF/ISPAD; 2011.
173. Mortensen HB, Robertson KJ, Aanstoot HJ, Danne T, Holl RW, Hougaard P, et al. Insulin management and metabolic control of type 1 diabetes mellitus in childhood and adolescence in 18 countries. Hvidovre Study Group on Childhood Diabetes. *Diabet Med* 1998;15(9):752-9.
174. Weissberg-Benchell J, Wolpert H, Anderson BJ. Transitioning from pediatric to adult care: a new approach to the post-adolescent young person with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2007;30(10):2441-6.
175. Court JM, Cameron FJ, Berg-Kelly K, Swift PG. Diabetes in adolescence. *Pediatr Diabetes* 2009;10 Suppl 12:185-94.
176. Dabadghao P, Vidmar S, Cameron FJ. Deteriorating diabetic control through adolescence-do the origins lie in childhood? *Diabet Med* 2001;18(11):889-94.
177. Bryden KS, Neil A, Mayou RA, Peveler RC, Fairburn CG, Dunger DB. Eating habits, body weight, and insulin misuse. A longitudinal study of teenagers and young adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22(12):1956-60.
178. Sawyer SM, Drew S, Yeo MS, Britto MT. Adolescents with a chronic condition: challenges living, challenges treating. *Lancet* 2007;369(9571):1481-9.
179. Jones JM, Lawson ML, Daneman D, Olmsted MP, Rodin G. Eating disorders in adolescent females with and without type 1 diabetes: cross sectional study. *BMJ* 2000;320(7249):1563-6.
180. Delahanty LM, Halford BN. The role of diet behaviors in achieving improved glycemic control in intensively treated patients in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 1993;16(11):1453-8.
181. Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A, et al. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care* 2002;25(1):148-98.
182. Overby NC, Margeisdottir HD, Brunborg C, Andersen LF, Dahl-Jorgensen K. The influence of dietary intake and meal pattern on blood glucose control in children and adolescents using intensive insulin treatment. *Diabetologia* 2007;50(10):2044-51.
183. Smart C, Aslander-van Vliet E, Waldron S. Nutritional management in children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes* 2009;10 Suppl 12:100-17.
184. Queiroz KC, Silva IN, Alfenas Rde C. [Relationship between nutrition factors and glycemic control in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*;54(3):319-25.
185. van Vliet M, Van der Heyden JC, Diamant M, Von Rosenstiel IA, Schindhelm RK, Aanstoot HJ, et al. Overweight is highly prevalent in children with type 1 diabetes and associates with cardiometabolic risk. *J Pediatr* 2010;156(6):923-9.
186. Knip M, Virtanen SM, Akerblom HK. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2010;91(5):1506S-13S.
187. Laffel L. Exercise: it isn't just child's play when it comes to managing type 1 diabetes. *J Pediatr* 2010;157(5):701-3.
188. Donaghue KC, Fung AT, Hing S, Fairchild J, King J, Chan A, et al. The effect of prepubertal diabetes duration on diabetes. Microvascular complications in early and late adolescence. *Diabetes Care* 1997;20(1):77-80.
189. Orchard TJ, Forrest KY, Kuller LH, Becker DJ. Lipid and blood pressure treatment goals for type 1 diabetes: 10-year incidence data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2001;24(6):1053-9.

190. Green A, Gale EA, Patterson CC. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study. *Lancet* 1992;339(8798):905-9.
191. Lam DW, LeRoith D. The worldwide diabetes epidemic. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19(2):93-6.
192. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes* 2007;8 Suppl 6:6-14.
193. Aguilera Montilla N, Pérez Blas M, López Santalla M, Martín Villa JM. Mucosal immune system: A brief review. *Inmunología* 2004;23(2):207-16.
194. McGhee JR, Fujihashi K. Inside the mucosal immune system. *PLoS Biol* 2012;10(9):e1001397.
195. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 1996;14:275-300.
196. Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 2003;21 Suppl 2:S12-23.
197. Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5(6):685-94.
198. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3(4):331-41.
199. Cutler CW, Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface. *J Dent Res* 2006;85(8):678-89.
200. Diamond G, Beckloff N, Ryan LK. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *J Dent Res* 2008;87(10):915-27.
201. Weindl G, Wagener J, Schaller M. Epithelial cells and innate antifungal defense. *J Dent Res* 2010;89(7):666-75.
202. Kinane DF, Podmore M, Murray MC, Hodge PJ, Ebersole J. Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontol* 2000 2001;26:54-91.
203. Atkinson JC, O'Connell A, Aframian D. Oral manifestations of primary immunological diseases. *J Am Dent Assoc* 2000;131(3):345-56.
204. Male DB, J. Roth, D. Roitt, I. . Immunology. 7th Ed ed: Mosby; 2006.
205. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Hofling JF, Goncalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci* 2010;52(2):177-85.
206. Walker DM. Oral mucosal immunology: an overview. *Ann Acad Med Singapore* 2004;33(4 Suppl):27-30.
207. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 2006;34(5):599-608.
208. Tabak LA. In defense of the oral cavity: the protective role of the salivary secretions. *Pediatr Dent* 2006;28(2):110-7; discussion 92-8.
209. Czerkinsky C, Anjuere F, McGhee JR, George-Chandy A, Holmgren J, Kiely MP, et al. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunol Rev* 1999;170:197-222.
210. Gormley PD, Powell-Richards AO, Azuara-Blanco A, Donoso LA, Dua HS. Lymphocyte subsets in conjunctival mucosa-associated-lymphoid-tissue after exposure to retinal-S-antigen. *Int Ophthalmol* 1998;22(2):77-80.
211. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(9):699-710.
212. Jurevic RJ, Chrisman P, Mancl L, Livingston R, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations. *Genet Test* 2002;6(4):261-9.
213. Krisanaprakomkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000;68(5):2907-15.
214. Fabian TK, Hermann P, Beck A, Fejerdy P, Fabian G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci* 2012;13(4):4295-320.
215. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002;110(2):121-4.
216. Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet* 2002;360(9340):1116-7.
217. Abe T, Hara Y, Aono M. Penetration, clearance and retention of antigen en route from the gingival sulcus to the draining lymph node of rats. *J Periodontol Res* 1991;26(5):429-39.
218. Ruby J, Barbeau J. The buccal puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Can J Infect Dis* 2002;13(1):34-41.
219. Marsh PD, Percival RS. The oral microflora--friend or foe? Can we decide? *Int Dent J* 2006;56(4 Suppl 1):233-9.
220. Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE. Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. *Front Immunol* 2012;3:118.
221. Rodd HD, Boissonade FM. Immunocytochemical investigation of immune cells within human primary and permanent tooth pulp. *Int J Paediatr Dent* 2006;16(1):2-9.
222. Trowbridge HO. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. *J Endod* 1990;16(2):54-61.
223. Streuli M, Morimoto C, Schrieber M, Schlossman SF, Saito H. Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens. *J Immunol* 1988;141(11):3910-4.
224. Buduneli N, Bicakci N, Keskinoglu A. Flow-cytometric analysis of lymphocyte subsets and mCD14 expression in patients with various periodontitis categories. *J Clin Periodontol* 2001;28(5):419-24.
225. Toddar K. *Toddar's Online Textbook of Bacteriology*; 2013.
226. Koutouzis T, Haber D, Shaddox L, Aukhil I, Wallet SM. Autoreactivity of serum immunoglobulin to periodontal tissue components: a pilot study. *J Periodontol* 2009;80(4):625-33.
227. Anusakathien O, Dolby AE. Autoimmunity in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 1991;20(3):101-7.
228. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2010;89(9):943-7.
229. Mizobe-Ono LA, LP. Dos-Santos, M.C. Componentes das imunidades inata e adaptativa presentes na saliva humana. *ROU* 2006;35(4):253-61.
230. Back M, Hlawaty H, Labat C, Michel JB, Brink C. The oral cavity and age: a site of chronic inflammation? *PLoS One* 2007;2(12):e1351.
231. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun* 2005;73(9):5675-84.
232. Nikawa H, Samaranyake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol* 1993;38(12):1057-63.
233. Amerongen AV, Veerman EC. Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002;8(1):12-22.
234. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40(7):395-405.
235. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res* 2004;38(3):247-53.
236. Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J Dent Res* 2005;84(5):445-50.
237. Rudney JD, Hickey KL, Ji Z. Cumulative correlations of lysozyme, lactoferrin, peroxidase, S-IgA, amylase, and total protein concentrations with adherence of oral viridans streptococci to microplates coated with human saliva. *J Dent Res* 1999;78(3):759-68.
238. Ashkenazi M, Dennison DK. A new method for isolation of salivary neutrophils and determination of their functional activity. *J Dent Res* 1989;68(8):1256-61.

239. Shapira L, Tepper P, Steinberg D. The interactions of human neutrophils with the constituents of an experimental dental biofilm. *J Dent Res* 2000;79(10):1802-7.
240. Aps JK, Van den Maagdenberg K, Delanghe JR, Martens LC. Flow cytometry as a new method to quantify the cellular content of human saliva and its relation to gingivitis. *Clin Chim Acta* 2002;321(1-2):35-41.
241. Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. *J Oral Pathol Med* 1993;22(4):168-74.
242. Takubo T, Yamane T, Tsuda I, Tagawa S, Tatsumi N. Polymorphonuclear neutrophils in saliva and blood: a comparative study of morphology, function and phenotype. *Br J Biomed Sci* 1997;54(4):260-6.
243. Van Dyke TE, Hoop GA. Neutrophil function and oral disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990;1(2):117-33.
244. Scully C. Phagocytic and killing activity of human blood, gingival crevicular, and salivary polymorphonuclear leukocytes for oral streptococci. *J Dent Res* 1982;61(5):636-9.
245. Lukac J, Mravak-Stipetic M, Knezevic M, Vrcek J, Sistic S, Ledinsky M, et al. Phagocytic functions of salivary neutrophils in oral mucous membrane diseases. *J Oral Pathol Med* 2003;32(5):271-4.
246. Tanida T, Ueta E, Tobiume A, Hamada T, Rao F, Osaki T. Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva. *J Oral Pathol Med* 2001;30(6):328-35.
247. Sorsa T, Suomalainen K, Uitto VJ. The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 1990;35 Suppl:193S-96S.
248. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand* 2001;59(3):167-73.
249. Seymour GJ, Crouch MS, Powell RN. The phenotypic characterization of lymphoid cell subpopulations in gingivitis in children. *J Periodontol Res* 1981;16(5):582-92.
250. Alcoforado GA, Kristoffersen T, Johannessen AC, Nilsen R. The composition of gingival inflammatory cell infiltrates in children studied by enzyme histochemistry. *J Clin Periodontol* 1990;17(6):335-40.
251. Fujihashi K, Yamamoto M, Hiroi T, Bamberg TV, McGhee JR, Kiyono H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+) T cells isolated from inflamed human gingival tissues. *Clin Exp Immunol* 1996;103(3):422-8.
252. Demir T, Orbak R, Tezel A, Canakc V, Kaya H. The changes in the T-lymphocyte subsets in a population of Turkish children with puberty gingivitis. *Int J Paediatr Dent* 2009;19(3):206-12.
253. Lappin MB, Campbell JD. The Th1-Th2 classification of cellular immune responses: concepts, current thinking and applications in haematological malignancy. *Blood Rev* 2000;14(4):228-39.
254. Hurst SD, Seymour BW, Muchamuel T, Kurup VP, Coffman RL. Modulation of inhaled antigen-induced IgE tolerance by ongoing Th2 responses in the lung. *J Immunol* 2001;166(8):4922-30.
255. Tanaka M, Hirabayashi Y, Gatanaga H, Aizawa S, Hachiya A, Takahashi Y, et al. Reduction in interleukin-2-producing cells but not Th1 to Th2 shift in moderate and advanced stages of human immunodeficiency virus type-1-infection: direct analysis of intracellular cytokine concentrations in CD4+ CD8- T cells. *Scand J Immunol* 1999;50(5):550-4.
256. Lorenzi JCC, Barbosa-Lorenzi V. C., Zanette, D. L. Linfócitos T CD4+ e a resposta imune. *Scire Salutis* 2012;2(1):5-9.
257. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000;21(10):479-83.
258. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
259. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787-93.
260. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18(6):263-6.
261. Chtanova T, Mackay CR. T cell effector subsets: extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol* 2001;78:233-66.
262. Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 2001;59(3):154-60.
263. Kinane DF, Lappin DF, Koulouri O, Buckley A. Humoral immune responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune features. *Clin Exp Immunol* 1999;115(3):534-41.
264. Nagasawa T, Nitta H, Watanabe H, Ishikawa I. Reduced CD8+ peripheral blood T lymphocytes in rapidly progressive periodontitis. *Arch Oral Biol* 1995;40(7):605-8.
265. Katz J, Goultschin J, Benoliel R, Schlesinger M. Peripheral T lymphocyte subsets in rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 1988;15(4):266-8.
266. Johannessen AC, Nilsen R, Knudsen GE, Kristoffersen T. In situ characterization of mononuclear cells in human chronic marginal periodontitis using monoclonal antibodies. *J Periodontol Res* 1986;21(2):113-27.
267. Meng HX, Zheng LF. T cells and T-cell subsets in periodontal diseases. *J Periodontol Res* 1989;24(2):121-6.
268. Kinane DF, Johnston FA, Evans CW. Depressed helper-to-suppressor T-cell ratios in early-onset forms of periodontal disease. *J Periodontol Res* 1989;24(3):161-4.
269. Stoufi ED, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ, Stashenko PP. Phenotypic analyses of mononuclear cells recovered from healthy and diseased human periodontal tissues. *J Clin Immunol* 1987;7(3):235-45.
270. Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontol Res* 1993;28(6 Pt 2):478-86.
271. Stoufi ED, Taubman MA, Lundqvist CA, Smith DJ, Ebersole JL. A method for studying immunoglobulin synthesis by gingival cells. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3(3):108-12.
272. Isaza-Guzman DM, Aristizabal-Cardona D, Martinez-Pabon MC, Velasquez-Echeverri H, Tobon-Arroyave SI. Estimation of sCD14 levels in saliva obtained from patients with various periodontal conditions. *Oral Dis* 2008;14(5):450-6.
273. Segquier S, Godeau G, Brousse N. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. *J Periodontol* 2000;71(7):1079-85.
274. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol* 2003;74(2):196-201.
275. Ogawa T, Tarkowski A, McGhee ML, Moldoveanu Z, Mestecky J, Hirsch HZ, et al. Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cells from localized chronic inflammatory tissue. *J Immunol* 1989;142(4):1150-8.
276. Kilian M, Ellegaard B, Mestecky J. Distribution of immunoglobulin isotypes including IgA subclasses in adult, juvenile, and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 1989;16(3):179-84.
277. Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, Yamamoto M, McGhee JR, Mestecky J, et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *J Periodontol* 1993;64(5 Suppl):400-6.
278. Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2004;75(1):37-43.
279. Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Taubman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res* 2000;79(8):1548-55.
280. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol* 2003;30(2):145-53.

281. Gonzales JR, Herrmann JM, Boedeker RH, Francz PI, Biesalski H, Meyle J. Concentration of interleukin-1 beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 2001;28(6):544-9.
282. Honda T, Doman H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol* 2006;144(1):35-40.
283. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res* 2000;14:40-7.
284. Bergandi L, Defabianis P, Re F, Preti G, Aldieri E, Garetto S, et al. Absence of soluble CD14 in saliva of young patients with dental caries. *Eur J Oral Sci* 2007;115(2):93-6.
285. Nyvad B. Diagnosis versus detection of caries. *Caries Res* 2004;38(3):192-8.
286. Tranaeus S, Shi XQ, Angmar-Mansson B. Caries risk assessment: methods available to clinicians for caries detection. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33(4):265-73.
287. de Soet JJ, Schriks MC, Kratz E, Poland DC, van Dijk W, van Amerongen WE. Dental caries related to plasma IgG and alpha-1-acid glycoprotein. *Caries Res* 2003;37(2):79-84.
288. Koga-Ito CY, Unterkircher CS, Watanabe H, Martins CA, Vidotto V, Jorge AO. Caries risk tests and salivary levels of immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in mouthbreathing syndrome patients. *Caries Res* 2003;37(1):38-43.
289. Skogedal O, Tronstad L. An attempt to correlate dentin and pulp changes in human carious teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;43(1):135-40.
290. Duggal MS, Nooh A, High A. Response of the primary pulp to inflammation: a review of the Leeds studies and challenges for the future. *Eur J Paediatr Dent* 2002;3(3):111-4.
291. De Soet JJ, van Gemert-Schriks MC, Laine ML, van Amerongen WE, Morre SA, van Winkelhoff AJ. Host and microbiological factors related to dental caries development. *Caries Res* 2008;42(5):340-7.
292. Hahn CL, Best AM, Tew JG. Comparison of type 1 and type 2 cytokine production by mononuclear cells cultured with *Streptococcus mutans* and selected other caries bacteria. *J Endod* 2004;30(5):333-8.
293. Kim SA, Lim SS. T lymphocyte subpopulations and interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 in rat pulpitis experimentally induced by specific bacteria. *J Endod* 2002;28(3):202-5.
294. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod* 2007;33(7):773-81.
295. Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression—part of host defence in pulpitis. *Cytokine* 2003;22(3-4):84-8.
296. Adachi T, Nakanishi T, Yumoto H, Hirao K, Takahashi K, Mukai K, et al. Caries-related bacteria and cytokines induce CXCL10 in dental pulp. *J Dent Res* 2007;86(12):1217-22.
297. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod* 2007;33(6):643-51.
298. Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod* 2007;33(3):213-9.
299. Russell MW, Childers NK, Michalek SM, Smith DJ, Taubman MA. A Caries Vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. *Caries Res* 2004;38(3):230-5.
300. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. *Vaccine* 2002;20(16):2027-44.
301. Smith DJ. Prospects in caries vaccine development. *J Dent Res* 2012;91(3):225-6.
302. Smith DJ, Taubman MA. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3(1-2):109-33.
303. Smith DJ, King WF, Akita H, Taubman MA. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial *Streptococcus mutans* streptococcal infection. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13(5):278-85.
304. Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM. Secretory immunity in defense against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1999;33(1):4-15.
305. Childers NK, Tong G, Li F, Dasanayake AP, Kirk K, Michalek SM. Humans immunized with *Streptococcus mutans* antigens by mucosal routes. *J Dent Res* 2002;81(1):48-52.
306. Smith DJ. Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Expert Rev Vaccines* 2010;9(1):1-3.
307. Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nat Rev Immunol* 2006;6(7):555-63.
308. Conti HR, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect* 2010.
309. de Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 2004;7(4):324-9.
310. Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL, Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res* 2005;84(11):966-77.
311. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol* 2005;129(5):569-82.
312. Romani L, Montagnoli C, Bozza S, Perruccio K, Spreca A, Allavena P, et al. The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *Int Immunol* 2004;16(1):149-61.
313. Heimdahl A, Nord CE. Oral yeast infections in immunocompromised and seriously diseased patients. *Acta Odontol Scand* 1990;48(1):77-84.
314. Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A. An outline of the role of anti-*Candida* antibodies within the context of passive immunization and protection from candidiasis. *Curr Mol Med* 2005;5(4):377-82.
315. Ashman RB, Farah CS, Wanasasakul S, Hu Y, Pang G, Clancy RL. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunol Cell Biol* 2004;82(2):196-204.
316. Fidel PL, Jr. *Candida*-host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res* 2006;19(1):80-4.
317. Wilson RM. Neutrophil function in diabetes. *Diabet Med* 1986;3(6):509-12.
318. Cenci E, Mencacci A, Spaccapelo R, Tonnetti L, Mosci P, Enssle KH, et al. T helper cell type 1 (Th1)- and Th2-like responses are present in mice with gastric candidiasis but protective immunity is associated with Th1 development. *J Infect Dis* 1995;171(5):1279-88.
319. Suttmoller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006;116(2):485-94.
320. Ali A, Natah S, Kontinen Y. Differential expression of Toll-like receptors in chronic hyperplastic candidosis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23(4):299-307.
321. van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2008;11(4):305-12.
322. Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol* 1998;69(10):1139-47.
323. Ueta E, Tanida T, Doi S, Osaki T. Regulation of *Candida albicans* growth and adhesion by saliva. *J Lab Clin Med* 2000;136(1):66-73.
324. Vazquez-Torres A, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61(2):170-92.
325. Wellington M, Dolan K, Kryan DJ. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* 2009;77(1):405-13.
326. Mowat A, Baum J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971;284(12):621-7.
327. Tater D, Tepaut B, Bercovici JP, Youinou P. Polymorphonuclear cell derangements in type I diabetes. *Horm Metab Res* 1987;19(12):642-7.
328. Hostetter MK. Handicaps to host defense. Effects of hyperglycemia on C3 and *Candida albicans*. *Diabetes* 1990;39(3):271-5.

329. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allanic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 1997;14(1):29-34.
330. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26(3-4):259-65.
331. Soysa NS, Samaranyake LP, Ellepola AN. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet Med* 2006;23(5):455-9.
332. Matthews RC, Burnie JP, Howat D, Rowland T, Walton F. Autoantibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis. *Immunology* 1991;74(1):20-4.
333. Matthews R, Burnie J. The role of hsp90 in fungal infection. *Immunol Today* 1992;13(9):345-8.
334. Matthews RC. The 14th C. L. Oakley Lecture. *Candida albicans* HSP 90: link between protective and auto immunity. *J Med Microbiol* 1992;36(6):367-70.
335. Drozdowska A DJ. Mycoses in diabetes - difficult diagnostic and therapeutic problem. Review of literature. *Diabetologia Doswiadczalna i Kliniczna* 2008;8(1):1-11.
336. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002;78(922):455-9.
337. Lamey PJ, Darwaza A, Fisher BM, Samaranyake LP, MacFarlane TW, Frier BM. Secretor status, candidal carriage and candidal infection in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol* 1988;17(7):354-7.
338. Blackwell CC, Aly FZ, James VS, Weir DM, Collier A, Patrick AW, et al. Blood group, secretor status and oral carriage of yeasts among patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res* 1989;12(3):101-4.
339. Thom SM, Blackwell CC, MacCallum CJ, Weir DM, Brettle RP, Kinane DF, et al. Non-secretion of blood group antigens and susceptibility to infection by *Candida* species. *FEMS Microbiol Immunol* 1989;1(6-7):401-5.
340. Darwazeh AM, Lamey PJ, Samaranyake LP, MacFarlane TW, Fisher BM, Macrury SM, et al. The relationship between colonisation, secretor status and in-vitro adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from diabetics. *J Med Microbiol* 1990;33(1):43-9.
341. Ben-Aryeh H, Blumfield E, Szargel R, Laufer D, Berdicevsky I. Oral *Candida* carriage and blood group antigen secretor status. *Mycoses* 1995;38(9-10):355-8.
342. Shin ES, Chung SC, Kim YK, Lee SW, Kho HS. The relationship between oral *Candida* carriage and the secretor status of blood group antigens in saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96(1):48-53.
343. Cameron BJ, Douglas LJ. Blood group glycolipids as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *Infect Immun* 1996;64(3):891-6.
344. Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M, Weitgasser R, Stoiber W. *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(1):60-4.
345. Steele C, Leigh J, Swoboda R, Fidel PL, Jr. Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *J Infect Dis* 2000;182(5):1479-85.
346. Steele C, Leigh J, Swoboda R, Ozenci H, Fidel PL, Jr. Potential role for a carbohydrate moiety in anti-*Candida* activity of human oral epithelial cells. *Infect Immun* 2001;69(11):7091-9.
347. Fidel PL, Jr. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* 2002;40(4):359-75.
348. Fidel PL, Jr. Immunity to *Candida*. *Oral Dis* 2002;8 Suppl 2:69-75.
349. Farah CS, Elahi S, Drysdale K, Pang G, Gotjamanos T, Seymour GJ, et al. Primary role for CD4(+) T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 2002;70(2):724-31.
350. Badauy CM, Barbachan JJ, Rados PV, Sant'ana Filho M, Chies JA. Relationship between *Candida* infection and immune cellular response in inflammatory hyperplasia. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(2):89-92.
351. Hibino K, Wong RW, Hagg U, Samaranyake LP. The effects of orthodontic appliances on *Candida* in the human mouth. *Int J Paediatr Dent* 2009;19(5):301-8.
352. Edgerton M, Koshlukova SE, Lo TE, Chrzan BG, Straubinger RM, Raj PA. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998;273(32):20438-47.
353. Romani L. Immunology of invasive candidiasis. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 233-41.
354. d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 2000;191(10):1661-74.
355. Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type I diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92(3):281-91.
356. Lamey PJ, Darwazeh AM, Frier BM. Oral disorders associated with diabetes mellitus. *Diabet Med* 1992;9(5):410-6.
357. Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies. I. Prevalence and characteristics of non-candidal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89(5):563-9.
358. Miralles L, Silvestre FJ, Hernandez-Mijares A, Bautista D, Llambes F, Grau D. Dental caries in type I diabetics: influence of systemic factors of the disease upon the development of dental caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(3):E256-60.
359. Bell GW, Large DM, Barclay SC. Oral health care in diabetes mellitus. *Dent Update* 1999;26(8):322-8, 30.
360. Rees TD. The diabetic dental patient. *Dent Clin North Am* 1994;38(3):447-63.
361. Patino Marin N, Loyola Rodriguez JP, Medina Solis CE, Pontigo Loyola AP, Reyes Macias JF, Ortega Rosado JC, et al. Caries, periodontal disease and tooth loss in patients with diabetes mellitus types I and 2. *Acta Odontol Latinoam* 2008;21(2):127-33.
362. Vasconcelos BC, Novaes M, Sandrini FA, Maranhao Filho AW, Coimbra LS. Prevalence of oral mucosa lesions in diabetic patients: a preliminary study. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008;74(3):423-8.
363. Moore PA, Guggenheimer J, Orchard T. Burning mouth syndrome and peripheral neuropathy in patients with type I diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2007;21(6):397-402.
364. Pater A, Odrowaz-Sypniewska G. Alterations of bone metabolism in children and adolescents with diabetes mellitus type I. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2011;17(3):158-61.
365. Pitts NB. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? *Caries Res* 2004;38(3):294-304.
366. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007;369(9555):51-9.
367. Tsang P, Qi F, Shi W. Medical approach to dental caries: fight the disease, not the lesion. *Pediatr Dent* 2006;28(2):188-91; discussion 92-8.
368. Locker D. Deprivation and oral health: a review. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28(3):161-9.
369. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004;32(5):319-21.
370. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr* 2004;7(1A):201-26.
371. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent* 2009;22(1):3-8.
372. Tagliaferro EP, Ambrosano GM, Meneghim Mde C, Pereira AC. Risk indicators and risk predictors of dental caries in schoolchildren. *J Appl Oral Sci* 2008;16(6):408-13.
373. Featherstone JD. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res* 2004;83 Spec No C:C39-42.
374. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compend Contin Educ Dent* 2009;30(2):76-8, 80, 83-7; quiz 88, 90.

375. Fontana M, Young DA, Wolff MS. Evidence-based caries, risk assessment, and treatment. *Dent Clin North Am* 2009;53(1):149-61, x.
376. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 2008;42(6):409-18.
377. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25(1):5-12.
378. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J* 2008;53(3):286-91.
379. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004;38(3):182-91.
380. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Ecologic factors in dental caries. The fate of antibiotic-resistant cariogenic streptococci in hamsters. *Am J Pathol* 1963;42:759-72.
381. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc* 1960;61:9-19.
382. Tanzer JM. Dental caries is a transmissible infectious disease: the Keyes and Fitzgerald revolution. *J Dent Res* 1995;74(9):1536-42.
383. Powell LV. Caries prediction: a review of the literature. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998;26(6):361-71.
384. Islam B, Khan SN, Khan AU. Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit* 2007;13(11):RA196-203.
385. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8(2):263-71.
386. Scheie AA, Petersen FC. The Biofilm Concept: Consequences for Future Prophylaxis of Oral Diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(1):4-12.
387. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* 2006;6 Suppl 1:S14.
388. Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res* 2009;43(2):83-91.
389. Kutsch VK, Young DA. New directions in the etiology of dental caries disease. *J Calif Dent Assoc* 2011;39(10):716-21.
390. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* 2003;69(11):722-4.
391. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent* 2003;28(1):47-52.
392. Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004;83 Spec No C:C35-8.
393. Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:255-345.
394. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of remineralization and fluoride in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 3). *J Clin Pediatr Dent* 2004;28(3):203-14.
395. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). *J Clin Pediatr Dent* 2004;28(2):119-24.
396. ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2(3):283-96.
397. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res* 2006;85(10):878-87.
398. ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand* 1999;57(6):325-9.
399. Robinson PG, Deacon SA, Deery C, Heanue M, Walmsley AD, Worthington HV, et al. Manual versus powered toothbrushing for oral health. *Cochrane Database Syst Rev* 2005(2):CD002281.
400. Jawed M, Shahid SM, Qader SA, Azhar A. Dental caries in diabetes mellitus: role of salivary flow rate and minerals. *J Diabetes Complications* 2010.
401. Muratsu K, Morioka T. Levels of salivary lysozyme, lactoperoxidase, and lactoferrin in diabetic hamsters. *Infect Immun* 1985;48(2):389-94.
402. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 2005;33(3):223-33.
403. Shifa S, Muthu MS, Amaral D, Rathna Prabhu V. Quantitative assessment of IgA levels in the unstimulated whole saliva of caries-free and caries-active children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2008;26(4):158-61.
404. Dowd FJ. Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am* 1999;43(4):579-97.
405. Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25(1):82-6.
406. Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, et al. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Res* 1999;33(3):191-5.
407. Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res* 2001;35(2):149-55.
408. Beighton D, Brailsford S, Samaranyake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, et al. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *Community Dent Health* 2004;21(1 Suppl):96-101.
409. Odds FC. *Candida* and Candidosis: a review and bibliography. 2nd ed. London: Baillière Tindal 1988.
410. Pieniakkinen K. Salivary lactobacilli and yeasts in relation to caries increment. Annually repeated measurements versus a single determination. *Acta Odontol Scand* 1988;46(1):57-62.
411. Russell JJ, MacFarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW, Burchell CK. Caries prevalence and microbiological and salivary caries activity tests in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol* 1990;18(3):120-5.
412. Beighton D, Adamson A, Rugg-Gunn A. Associations between dietary intake, dental caries experience and salivary bacterial levels in 12-year-old English schoolchildren. *Arch Oral Biol* 1996;41(3):271-80.
413. Starr JR, White TC, Leroux BG, Luis HS, Bernardo M, Leitao J, et al. Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(5):304-10.
414. Rozkiewicz D, Daniluk T, Zaremba ML, Cylwik-Rokicka D, Stokowska W, Pawinska M, et al. Oral *Candida albicans* carriage in healthy preschool and school children. *Adv Med Sci* 2006;51 Suppl 1:187-90.
415. Signoretto C, Burlacchini G, Faccioni F, Zanderigo M, Bozzola N, Canepari P. Support for the role of *Candida* spp. in extensive caries lesions of children. *New Microbiol* 2009;32(1):101-7.
416. Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res* 2001;35(6):397-406.
417. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol* 2006;51(11):1024-8.
418. Sziegoleit F, Sziegoleit A, Wetzel WE. Effect of dental treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida*. *Med Mycol* 1999;37(5):345-50.
419. Ugun-Can B, Kadir T, Akyuz S. Oral candidal carriage in children with and without dental caries. *Quintessence Int* 2007;38(1):45-9.
420. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Funukawa M, et al. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003;46(11-12):471-8.

421. Thaweboon S, Thaweboon B, Nakomchai S, Jitmairee S. Salivary secretory IgA, pH, flow rates, mutans streptococci and Candida in children with rampant caries. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008;39(5):893-9.
422. das Chagas MS, Portela MB, Cerqueira DF, de Souza IP, Soares RM, Castro GF. Reduction of Candida species colonization in the oral cavity of children infected with human immunodeficiency virus after dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(3):383-8.
423. Cannon RD, Nand AK, Jenkinson HF. Adherence of Candida albicans to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology* 1995;141 (Pt 1):213-9.
424. Makihiro S, Nikawa H, Tamagami M, Hamada T, Nishimura H, Ishida K, et al. Bacterial and Candida adhesion to intact and denatured collagen in vitro. *Mycoses* 2002;45(9-10):389-92.
425. Scheinin A, Pieniakkinen K, Tiekso J, Holmberg S. Multifactorial modeling for root caries prediction. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992;20(1):35-7.
426. Raitio M, Pieniakkinen K, Scheinin A. Assessment of single risk indicators in relation to caries increment in adolescents. *Acta Odontol Scand* 1996;54(2):113-7.
427. Karjalainen KM, Knuutila ML, Kaar ML. Relationship between caries and level of metabolic balance in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Caries Res* 1997;31(1):13-18.
428. Samaranayake LP, Hughes A, MacFarlane TW. The proteolytic potential of Candida albicans in human saliva supplemented with glucose. *J Med Microbiol* 1984;17(1):13-22.
429. Samaranayake LP, Hughes A, Weetman DA, MacFarlane TW. Growth and acid production of Candida species in human saliva supplemented with glucose. *J Oral Pathol* 1986;15(5):251-4.
430. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994;5(2):125-57.
431. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J* 1979;147(10):267-72.
432. Kadir T, Pisiiriciler R, Akyuz S, Yarat A, Emekli N, Ipbuker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. *J Oral Rehabil* 2002;29(5):452-7.
433. Al-Attas SA, Amro SO. Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients. *Ann Saudi Med* 2010;30(2):101-8.
434. Vadiakas G. Case definition, aetiology and risk assessment of early childhood caries (ECC): a revisited review. *Eur Arch Paediatr Dent* 2008;9(3):114-25.
435. Uribe S. Early childhood caries--risk factors. *Evid Based Dent* 2009;10(2):37-8.
436. Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. *Oral Health Prev Dent* 2010;8(1):59-70.
437. Caufield PW, Li Y, Bromage TG. Hypoplasia-associated severe early childhood caries--a proposed definition. *J Dent Res* 2012;91(6):544-50.
438. Mitchell SC, Ruby JD, Moser S, Momeni S, Smith A, Osgood R, et al. Maternal transmission of mutans Streptococci in severe-early childhood caries. *Pediatr Dent* 2009;31(3):193-201.
439. Valaitis R, Hesch R, Passarelli C, Sheehan D, Sinton J. A systematic review of the relationship between breastfeeding and early childhood caries. *Can J Public Health* 2000;91(6):411-7.
440. Palmer CA, Kent R, Jr., Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N, et al. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. *J Dent Res* 2010;89(11):1224-9.
441. Misra S, Tahmassebi JF, Brosnan M. Early childhood caries--a review. *Dent Update* 2007;34(9):556-8, 61-2, 64.
442. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993;72(1):37-45.
443. Straetemans MM, van Loveren C, de Soet JJ, de Graaff J, ten Cate JM. Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. *J Dent Res* 1998;77(10):1851-5.
444. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of Streptococcus sanguinis in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun* 2000;68(7):4018-23.
445. Milgrom P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L, Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28(4):295-306.
446. Li Y, Dasanayake AP, Caufield PW, Elliott RR, Butts JT, 3rd. Characterization of maternal mutans streptococci transmission in an African American population. *Dent Clin North Am* 2003;47(1):87-101.
447. Carounanidy U, Sathyanarayanan R. Dental caries: A complete changeover (Part II)--Changeover in the diagnosis and prognosis. *J Conserv Dent* 2009;12(3):87-100.
448. Harris R, Nicoll AD, Adair PM, Pine CM. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. *Community Dent Health* 2004;21(1 Suppl):71-85.
449. Patel S, Bay RC, Glick M. A systematic review of dental recall intervals and incidence of dental caries. *J Am Dent Assoc* 2010;141(5):527-39.
450. Young DA, Featherstone JD, Roth JR, Anderson M, Autio-Gold J, Christensen GJ, et al. Caries management by risk assessment: implementation guidelines. *J Calif Dent Assoc* 2007;35(11):799-805.
451. Twetman S, Fontana M. Patient caries risk assessment. *Monogr Oral Sci* 2009;21:91-101.
452. Dreizen S. Oral candidiasis. *Am J Med* 1984;77(4D):28-33.
453. Reddy DK, Hegde AM, Munshi AK. Dental caries status of children with bronchial asthma. *J Clin Pediatr Dent* 2003;27(3):293-5.
454. Johnson MF. The role of risk factors in the identification of appropriate subjects for caries clinical trials: design considerations. *J Dent Res* 2004;83 Spec No C:C116-8.
455. Hilton IV, Stephen S, Barker JC, Weintraub JA. Cultural factors and children's oral health care: a qualitative study of carers of young children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007;35(6):429-38.
456. Petersen PE. Sociobehavioural risk factors in dental caries - international perspectives. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33(4):274-9.
457. Yeung CA, Hitchings JL, Macfarlane TV, Threlfall AG, Tickle M, Glenn AM. Fluoridated milk for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev* 2005(3):CD003876.
458. Elfrink ME, Schuller AA, Veerkamp JS, Poorterman JH, Moll HA, ten Cate BJ. Factors increasing the caries risk of second primary molars in 5-year-old Dutch children. *Int J Paediatr Dent* 2010;20(2):151-7.
459. Martignon S, Tellez M, Santamaria RM, Gomez J, Ekstrand KR. Sealing Distal Proximal Caries Lesions in First Primary Molars: Efficacy after 2.5 Years. *Caries Res* 2010;44(6):562-70.
460. Declerck D, Leroy R, Martens L, Lesaffre E, Garcia-Zattera MJ, Vanden Broucke S, et al. Factors associated with prevalence and severity of caries experience in preschool children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2008;36(2):168-78.
461. Tickle M. The 80:20 phenomenon: help or hindrance to planning caries prevention programmes? *Community Dent Health* 2002;19(1):39-42.
462. Dugmore CR. The 80:20 phenomenon (80:20 distribution of caries)--myth or fact. *Br Dent J* 2006;201(4):197-8.
463. Topping GV, Pitts NB. Clinical visual caries detection. *Monogr Oral Sci* 2009;21:15-41.
464. Pitts NB, Stamm JW. International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT)--final consensus statements: agreeing where the evidence leads. *J Dent Res* 2004;83 Spec No C:C125-8.

465. Stookey GK, Gonzalez-Cabezas C. Emerging methods of caries diagnosis. *J Dent Educ* 2001;65(10):1001-6.
466. Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ. A systematic review of the performance of methods for identifying carious lesions. *J Public Health Dent* 2002;62(4):201-13.
467. Pretty IA. Caries detection and diagnosis: novel technologies. *J Dent* 2006;34(10):727-39.
468. Neuhaus KW, Ellwood R, Lussi A, Pitts NB. Traditional lesion detection aids. *Monogr Oral Sci* 2009;21:42-51.
469. Neuhaus KW, Longbottom C, Ellwood R, Lussi A. Novel lesion detection aids. *Monogr Oral Sci* 2009;21:52-62.
470. Braga MM, Mendes FM, Martignon S, Ricketts DN, Ekstrand KR. In vitro comparison of Nyvad's system and ICDAS-II with Lesion Activity Assessment for evaluation of severity and activity of occlusal caries lesions in primary teeth. *Caries Res* 2009;43(5):405-12.
471. Gonzalez MC, Ruiz JA, Fajardo MC, Gomez AD, Moreno CS, Ochoa MJ, et al. Comparison of the def index with Nyvad's caries diagnostic criteria in 3- and 4-year-old Colombian children. *Pediatr Dent* 2003;25(2):132-6.
472. Baelum V, Heidmann J, Nyvad B. Dental caries paradigms in diagnosis and diagnostic research. *Eur J Oral Sci* 2006;114(4):263-77.
473. Chesters RK, Pitts NB, Matuliene G, Kvedariene A, Huntington E, Bendinskaite R, et al. An abbreviated caries clinical trial design validated over 24 months. *J Dent Res* 2002;81(9):637-40.
474. WHO. Oral Health Surveys - basic methods. Third edition ed. Geneva: World Health Organization; 1987.
475. Jablonski-Momeni A, Stachniss V, Ricketts DN, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Res* 2008;42(2):79-87.
476. Diniz MB, Rodrigues JA, Hug I, Cordeiro Rde C, Lussi A. Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for occlusal caries detection. *Community Dent Oral Epidemiol* 2009;37(5):399-404.
477. Shoaib L, Deery C, Ricketts DN, Nugent ZJ. Validity and reproducibility of ICDAS II in primary teeth. *Caries Res* 2009;43(6):442-8.
478. Mitropoulos P, Rahiotis C, Stamatakis H, Kakaboura A. Diagnostic performance of the visual caries classification system ICDAS II versus radiography and micro-computed tomography for proximal caries detection: an in vitro study. *J Dent* 2010;38(11):859-67.
479. Mendes FM, Braga MM, Oliveira LB, Antunes JL, Ardenghi TM, Bonecker M. Discriminant validity of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and comparability with World Health Organization criteria in a cross-sectional study. *Community Dent Oral Epidemiol* 2010;38(5):398-407.
480. Schulte AG, Momeni A, Pieper K. Caries prevalence in 12-year-old children from Germany. Results of the 2004 national survey. *Community Dent Health* 2006;23(4):197-202.
481. Honkala E, Runnel R, Honkala S, Olak J, Vahlberg T, Saag M, et al. Measuring Dental Caries in the Mixed Dentition by ICDAS. *Int J Dent* 2011;2011:150424.
482. Assaf AV, de Castro Meneghim M, Zanin L, Tengan C, Pereira AC. Effect of different diagnostic thresholds on dental caries calibration - a 12 month evaluation. *Community Dent Oral Epidemiol* 2006;34(3):213-9.
483. Agustsdottir H, Gudmundsdottir H, Eggertsson H, Jonsson SH, Gudlaugsson JO, Saemundsson SR, et al. Caries prevalence of permanent teeth: a national survey of children in Iceland using ICDAS. *Community Dent Oral Epidemiol* 2010;38(4):299-309.
484. Kuhnisch J, Berger S, Goddon I, Senkel H, Pitts N, Heinrich-Weltzien R. Occlusal caries detection in permanent molars according to WHO basic methods, ICDAS II and laser fluorescence measurements. *Community Dent Oral Epidemiol* 2008;36(6):475-84.
485. Ismail AI. Visual and visuo-tactile detection of dental caries. *J Dent Res* 2004;83 Spec No C:C56-66.
486. Cook SL, Martinez-Mier EA, Dean JA, Weddell JA, Sanders BJ, Eggertsson H, et al. Dental caries experience and association to risk indicators of remote rural populations. *Int J Paediatr Dent* 2008;18(4):275-83.
487. Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ. Systematic reviews of selected dental caries diagnostic and management methods. *J Dent Educ* 2001;65(10):960-8.
488. Pitts N. "ICDAS"--an international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health* 2004;21(3):193-8.
489. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007;35(3):170-8.
490. Braga MM, Oliveira LB, Bonini GA, Bonecker M, Mendes FM. Feasibility of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS-II) in epidemiological surveys and comparability with standard World Health Organization criteria. *Caries Res* 2009;43(4):245-9.
491. Benigeri M, Payette M, Brodeur JM. Comparison between the DMF indices and two alternative composite indicators of dental health. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998;26(5):303-9.
492. Schuller AA, Holst D. Oral status indicators DMFT and FS-T: reflections on index selection. *Eur J Oral Sci* 2001;109(3):155-9.
493. Klein M, Palmer CE. Studies on dental caries. V. Familial resemblance in the caries experience of siblings. *Public Health Rep* 1938;53:1353-64.
494. Pitts N. The impact of diagnosis criteria on estimates of prevalence, extent and severity of dental caries. In: Fejerskov O KE, editor. *Dental caries. The disease and its clinical management*. Singapore: Blackwell Munksgaard; 2008.
495. Marcenes WS, Sheiham A. Composite indicators of dental health: functioning teeth and the number of sound-equivalent teeth (T-Health). *Community Dent Oral Epidemiol* 1993;21(6):374-8.
496. Namal N, Vehid S, Sheiham A. Ranking countries by dental status using the DMFT and FS-T indices. *Int Dent J* 2005;55(6):373-6.
497. Namal N, Sheiham A. Comparison of ranking dental status using the Significant Caries Index and the Significant Filled and Sound-Teeth Index. *Community Dent Health* 2008;25(2):103-6.
498. Bratthall D. Introducing the Significant Caries Index together with a proposal for a new global oral health goal for 12-year-olds. *Int Dent J* 2000;50(6):378-84.
499. Nishi M, Stjernsward J, Carlsson P, Bratthall D. Caries experience of some countries and areas expressed by the Significant Caries Index. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002;30(4):296-301.
500. Campus G, Solinas G, Maida C, Castiglia P. The 'Significant Caries Index' (SiC): a critical approach. *Oral Health Prev Dent* 2003;1(3):171-8.
501. Marthaler T, Menghini G, Steiner M. Use of the Significant Caries Index in quantifying the changes in caries in Switzerland from 1964 to 2000. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33(3):159-66.
502. Morgan MZ, Chestnutt IG, Treasure ET. Summary measures of caries prevalence to describe high-risk communities. *Community Dent Health* 2005;22(4):246-52.
503. Batchelor PA, Sheiham A. The Distribution of Burden of Dental Caries in Schoolchildren: A Critique of the High Risk Caries Prevention Strategy for Populations. *BMC Oral Health* 2006;6(1):3.
504. Batchelor P, Sheiham A. The limitations of a 'high-risk' approach for the prevention of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002;30(4):302-12.
505. Burt BA. Concepts of risk in dental public health. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33(4):240-7.
506. Birkeland JM, Haugejorden O, von der Fehr FR. Analyses of the caries decline and incidence among Norwegian adolescents 1985-2000. *Acta Odontol Scand* 2002;60(5):281-9.
507. Birkeland JM, Haugejorden O, von der Fehr FR. Some factors associated with the caries decline among Norwegian children and adolescents: age-specific and cohort analyses. *Caries Res* 2000;34(2):109-16.
508. Mjor IA, Holst D, Eriksen HM. Caries and restoration prevention. *J Am Dent Assoc* 2008;139(5):565-70; quiz 626.

509. Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry--a review. FDI Commission Project I-97. *Int Dent J* 2000;50(1):1-12.
510. Ismail AI, Sohn W, Lim S, Willem JM. Predictors of dental caries progression in primary teeth. *J Dent Res* 2009;88(3):270-5.
511. White JM, Eakle WS. Rationale and treatment approach in minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc* 2000;131 Suppl:135-195.
512. Ericson D. The concept of minimally invasive dentistry. *Dent Update* 2007;34(1):9-10, 12-4, 17-8.
513. Zero DT, Fontana M, Martinez-Mier EA, Ferreira-Zandona A, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, et al. The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc* 2009;140 Suppl 1:255-345.
514. Zandona AF, Zero DT. Diagnostic tools for early caries detection. *J Am Dent Assoc* 2006;137(12):1675-84; quiz 730.
515. Konig KG. Diet and oral health. *Int Dent J* 2000;50(3):162-74.
516. Seppa L. The future of preventive programs in countries with different systems for dental care. *Caries Res* 2001;35 Suppl 1:26-9.
517. Marthaler TM. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res* 2004;38(3):173-81.
518. Armfield JM, Spencer AJ. Community effectiveness of fissure sealants and the effect of fluoridated water consumption. *Community Dent Health* 2007;24(1):4-11.
519. Ly KA, Milgrom P, Rothen M. Xylitol, sweeteners, and dental caries. *Pediatr Dent* 2006;28(2):154-63; discussion 92-8.
520. Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent* 2008;33(6):710-6.
521. Azarpazhooh A, Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc* 2008;139(7):915-24; quiz 94-5.
522. Azarpazhooh A, Main PA. Pit and fissure sealants in the prevention of dental caries in children and adolescents: a systematic review. *J Can Dent Assoc* 2008;74(2):171-7.
523. Marinho VC. Evidence-based effectiveness of topical fluorides. *Adv Dent Res* 2008;20(1):3-7.
524. Davies RM, Davies GM. High fluoride toothpastes: their potential role in a caries prevention programme. *Dent Update* 2008;35(5):320-3.
525. Xu X, Li JY, Zhou XD, Xie Q, Zhan L, Featherstone JD. Randomized controlled clinical trial on the evaluation of bacteriostatic and cariostatic effects of a novel povidone-iodine/fluoride foam in children with high caries risk. *Quintessence Int* 2009;40(3):215-23.
526. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2010(1):CD007868.
527. Twetman S. Caries prevention with fluoride toothpaste in children: an update. *Eur Arch Paediatr Dent* 2009;10(3):162-7.
528. Topping G, Assaf A. Strong evidence that daily use of fluoride toothpaste prevents caries. *Evid Based Dent* 2005;6(2):32.
529. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2003(4):CD002782.
530. Hiiri A, Ahovuo-Saloranta A, Nordblad A, Makela M. Pit and fissure sealants versus fluoride varnishes for preventing dental decay in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2010(3):CD003067.
531. Berger S, Goddon I, Chen CM, Senkel H, Hickel R, Stosser L, et al. Are pit and fissure sealants needed in children with a higher caries risk? *Clin Oral Investig* 2010;14(5):613-20.
532. Ahovuo-Saloranta A, Hiiri A, Nordblad A, Makela M, Worthington HV. Pit and fissure sealants for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2008(4):CD001830.
533. Siudikiene J, Machiulskiene V, Nyvad B, Tenovuo J, Nedzelskiene I. Dental caries increments and related factors in children with type I diabetes mellitus. *Caries Res* 2008;42(5):354-62.
534. El-Tekeya M, El Tantawi M, Fetouh H, Mowafy E, Abo Khedr N. Caries risk indicators in children with type I diabetes mellitus in relation to metabolic control. *Pediatr Dent* 2012;34(7):510-6.
535. Tagelsir A, Cauwels R, van Aken S, Vanobbergen J, Martens LC. Dental caries and dental care level (restorative index) in children with diabetes mellitus type I. *Int J Paediatr Dent* 2011;21(1):13-22.
536. Arieta-Blanco JJ, Bartolome-Villar B, Jimenez-Martinez E, Saavedra-Vallejo P, Arieta-Blanco FJ. Bucco-dental problems in patients with Diabetes Mellitus (I) : Index of plaque and dental caries. *Med Oral* 2003;8(2):97-109.
537. Twetman S, Aronsson S, Bjorkman S. Mutans streptococci and lactobacilli in saliva from children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 1989;4(3):165-8.
538. Kirk JM, Kinirons MJ. Dental health of young insulin dependent diabetic subjects in Northern Ireland. *Community Dent Health* 1991;8(4):335-41.
539. Albrecht M, Banoczy J, Tamas G, Jr. Dental and oral symptoms of diabetes mellitus. *Community Dent Oral Epidemiol* 1988;16(6):378-80.
540. Bernick SM, Cohen DW, Baker L, Laster L. Dental disease in children with diabetes mellitus. *J Periodontol* 1975;46(4):241-5.
541. Faulconbridge AR, Bradshaw WC, Jenkins PA, Baum JD. The dental status of a group of diabetic children. *Br Dent J* 1981;151(8):253-5.
542. Goteiner D, Vogel R, Deasy M, Goteiner C. Periodontal and caries experience in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 1986;113(2):277-9.
543. Jones RB, McCallum RM, Kay EJ, Kirkin V, McDonald P. Oral health and oral health behaviour in a population of diabetic outpatient clinic attenders. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992;20(4):204-7.
544. Leeper SH, Kalkwarf KL, Strom EA. Oral status of "controlled" adolescent type I diabetics. *J Oral Med* 1985;40(3):127-33.
545. Matsson L, Koch G. Caries frequency in children with controlled diabetes. *Scand J Dent Res* 1975;83(6):327-32.
546. Samat H, Eliaz R, Geiman G, Flexer Z, Karp M, Laron Z. Carbohydrate consumption and oral status of diabetic and nondiabetic young adolescents. *Clin Prev Dent* 1985;7(4):20-3.
547. Swanijung O, Meurman JH, Torkko H, Sandholm L, Kaprio E, Maenpaa J. Caries and saliva in 12-18-year-old diabetics and controls. *Scand J Dent Res* 1992;100(6):310-3.
548. Lopez del Valle LM, Ocasio-Lopez C. Comparing the oral health status of diabetic and non-diabetic children from Puerto Rico: a case-control pilot study. *P R Health Sci J* 2011;30(3):123-7.
549. Bolgul BS, Celenk S, Ayna BE, Atakul F, Uysal E. Evaluation of caries risk factors and effects of a fluoride-releasing adhesive material in children with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM): initial first-year results. *Acta Odontol Scand* 2004;62(5):289-92.
550. Twetman S, Petersson GH, Bratthall D. Caries risk assessment as a predictor of metabolic control in young Type I diabetics. *Diabet Med* 2005;22(3):312-5.
551. Syrjala AM, Niskanen MC, Ylostalo P, Knuutila ML. Metabolic control as a modifier of the association between salivary factors and dental caries among diabetic patients. *Caries Res* 2003;37(2):142-7.
552. Twetman S, Johansson I, Birkhed D, Niderfors T. Caries incidence in young type I diabetes mellitus patients in relation to metabolic control and caries-associated risk factors. *Caries Res* 2002;36(1):31-5.
553. Edblad E, Lundin SA, Sjodin B, Aman J. Caries and salivary status in young adults with type I diabetes. *Swed Dent J* 2001;25(2):53-60.
554. Iughetti L, Marino R, Bertolani MF, Bemasconi S. Oral health in children and adolescents with IDDM--a review. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12(5 Suppl 2):603-10.
555. Siudikiene J, Machiulskiene V, Nyvad B, Tenovuo J, Nedzelskiene I. Dental caries and salivary status in children with type I diabetes mellitus, related to the metabolic control of the disease. *Eur J Oral Sci* 2006;114(1):8-14.

556. Saes Busato IM, Bittencourt MS, Machado MA, Gregio AM, Azevedo-Alanis LR. Association between metabolic control and oral health in adolescents with type I diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109(3):e51-6.
557. Miko S, Ambrus SJ, Sahafian S, Dinya E, Tamas G, Albrecht MG. Dental caries and adolescents with type I diabetes. *Br Dent J* 2010;208(6):E12.
558. Twetman S, Nederfors T, Stahl B, Aronson S. Two-year longitudinal observations of salivary status and dental caries in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Pediatr Dent* 1992;14(3):184-8.
559. do Amaral FM, Ramos PG, Ferreira SR. [Study on the frequency of caries and associated factors in type I diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006;50(3):515-22.
560. Tenovuo J, Alanen P, Larjava H, Viikari J, Lehtonen OP. Oral health of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Dent Res* 1986;94(4):338-46.
561. Canepari P, Zerman N, Cavalleri G. Lack of correlation between salivary *Streptococcus mutans* and lactobacilli counts and caries in IDDM children. *Minerva Stomatol* 1994;43(11):501-5.
562. Lopez ME, Colloca ME, Paez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A. Salivary characteristics of diabetic children. *Braz Dent J* 2003;14(1):26-31.
563. Belazi MA, Galli-Tsinopoulou A, Drakoulakos D, Fleva A, Papanayiotou PH. Salivary alterations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Paediatr Dent* 1998;8(1):29-33.
564. 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(4):219-24.
565. Ficara AJ, Levin MP, Grower MF, Kramer GD. A comparison of the glucose and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. *J Periodontol* 1975;10(3):171-5.
566. Sterky G, Kjellman O, Hogberg O, Lofroth AL. Dietary composition and dental disease in adolescent diabetics. A pilot study. *Acta Paediatr Scand* 1971;60(4):461-4.
567. Hullmann SE, Wolfe-Christensen C, Ryan JL, Fedele DA, Rambo PL, Chaney JM, et al. Parental overprotection, perceived child vulnerability, and parenting stress: a cross-illness comparison. *J Clin Psychol Med Settings* 2010;17(4):357-65.
568. Streisand R, Swift E, Wickmark T, Chen R, Holmes CS. Pediatric parenting stress among parents of children with type I diabetes: the role of self-efficacy, responsibility, and fear. *J Pediatr Psychol* 2005;30(6):513-21.
569. Thomasgard M, Metz WP. Parental overprotection and its relation to perceived child vulnerability. *Am J Orthopsychiatry* 1997;67(2):330-5.
570. Oh TJ, Eber R, Wang HL. Periodontal diseases in the child and adolescent. *J Clin Periodontol* 2002;29(5):400-10.
571. Firatli E. The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J Periodontol* 1997;68(2):136-40.
572. Soares DA, C. Pinto, A.R. Seabra, M. Macho, V. Doenças da gengiva e periodonto em crianças e adolescentes. *Acta Paediatr Port* 2009;40(1):23-29.
573. Kinane DF, Hodge PJ. Periodontal disease in children and adolescents: introduction and classification. *Periodontol 2000* 2001;26:7-15.
574. Periodontal diseases of children and adolescents. *Pediatr Dent* 2008;30(7 Suppl):240-7.
575. Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000* 2002;29:153-76.
576. Jenkins WM, Papapanou PN. Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents. *Periodontol 2000* 2001;26:16-32.
577. Tan WC, Tay FB, Lim LP. Diabetes as a risk factor for periodontal disease: current status and future considerations. *Ann Acad Med Singapore* 2006;35(8):571-81.
578. Soares D. Contribuição para a caracterização periodontal de uma população pediátrica da FMDUP [Porto: Porto; 2007].
579. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003;74(1):103-10.
580. Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol* 2007;78(10):1911-25.
581. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010;89(12):1349-63.
582. Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol* 1998;3(1):20-9.
583. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 2000;71(10):1528-34.
584. Kowolik MJ, Dowsett SA, Rodriguez J, De La Rosa RM, Eckert GJ. Systemic neutrophil response resulting from dental plaque accumulation. *J Periodontol* 2001;72(2):146-51.
585. Liljenberg B, Lindhe J, Berglundh T, Dahlen G, Jonsson R. Some microbiological, histopathological and immunohistochemical characteristics of progressive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1994;21(10):720-7.
586. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;1(1):821-78.
587. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res* 1991;26(3 Pt 2):230-42.
588. Ryan ME, Camu O, Kamer A. The influence of diabetes on the periodontal tissues. *J Am Dent Assoc* 2003;134 Spec No:345-405.
589. Tanwir F, Altamash M, Gustafsson A. Effect of diabetes on periodontal status of a population with poor oral health. *Acta Odontol Scand* 2009;67(3):129-33.
590. de Pommereau V, Dargent-Pare C, Robert JJ, Brion M. Periodontal status in insulin-dependent diabetic adolescents. *J Clin Periodontol* 1992;19(9 Pt 1):628-32.
591. Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications* 2006;20(1):59-68.
592. Chavarry NG, Vettore MV, Sansone C, Sheiham A. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. *Oral Health Prev Dent* 2009;7(2):107-27.
593. Miralles LS, F.J. Grau, D.M.Hernández, A. Estudio clínico sobre la patología bucodentaria en el paciente diabético tipo I. *Medicina Oral* 2002;7:298-302.
594. Mealey B. Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70(8):935-49.
595. Lappin DF, Eapen B, Robertson D, Young J, Hodge PJ. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type I diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2009;36(8):634-41.
596. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2009;36(9):765-74.
597. Xavier AC, Silva IN, Costa Fde O, Correa DS. [Periodontal status in children and adolescents with type I diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53(3):348-54.
598. Lal S, Cheng B, Kaplan S, Softness B, Greenberg E, Goland RS, et al. Gingival bleeding in 6- to 13-year-old children with diabetes mellitus. *Pediatr Dent* 2007;29(5):426-30.

599. Silvestre FJ, Miralles L, Llambes F, Bautista D, Sola-Izquierdo E, Hernandez-Mijares A. Type I diabetes mellitus and periodontal disease: relationship to different clinical variables. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14(4):E175-9.
600. Mealey BL. Periodontal disease and diabetes. A two-way street. *J Am Dent Assoc* 2006;137 Suppl:265-315.
601. Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol* 2001;6(1):91-8.
602. Carranza FAN, M.G. Irving Glickman's Clinical. Glickman P. Clinical periodontology, 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1996.
603. Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol* 2000 2001;25:37-58.
604. Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1988;59(1):23-31.
605. Sandholm L, Swanjung O, Rytomaa I, Kaprio EA, Maenpaa J. Periodontal status of Finnish adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1989;16(10):617-20.
606. Morinushi T, Lopatin DE, Syed SA, Bacon G, Kowalski CJ, Loesche WJ. Humoral immune response to selected subgingival plaque microorganisms in insulin-dependent diabetic children. *J Periodontol* 1989;60(4):199-204.
607. Mandell RL, Dirienzo J, Kent R, Joshipura K, Haber J. Microbiology of healthy and diseased periodontal sites in poorly controlled insulin dependent diabetics. *J Periodontol* 1992;63(4):274-9.
608. Mashimo PA, Yamamoto Y, Slots J, Park BH, Genco RJ. The periodontal microflora of juvenile diabetics. Culture, immunofluorescence, and serum antibody studies. *J Periodontol* 1983;54(7):420-30.
609. Sastrowijoto SH, Hillemans P, van Steenberghe TJ, Abraham-Inpijn L, de Graaff J. Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type I diabetes mellitus patients. *J Clin Periodontol* 1989;16(5):316-22.
610. Karjalainen KM, Knuutila ML. The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1996;23(12):1060-7.
611. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *J Clin Periodontol* 2000;27(7):453-65.
612. Sollecito TP, Sullivan KE, Pinto A, Stewart J, Korostoff J. Systemic conditions associated with periodontitis in childhood and adolescence. A review of diagnostic possibilities. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10(2):142-50.
613. Bascones A, Gamonal J, Gomez M, Silva A, Gonzalez MA. New knowledge of the pathogenesis of periodontal disease. *Quintessence Int* 2004;35(9):706-16.
614. Lalla E, Lamster IB, Schmidt AM. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. *Ann Periodontol* 1998;3(1):13-9.
615. Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease. *J Periodontol* 1981;52(8):410-5.
616. Oxford GE, Tayari L, Barfoot MD, Peck AB, Tanaka Y, Humphreys-Beher MG. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2000;14(3):140-5.
617. Preshaw PM. Periodontal disease and diabetes. *J Dent* 2009;37(8):S575-7.
618. McNeely MJ, Boyko EJ, Weigle DS, Shofer JB, Chessler SD, Leonnetti DL, et al. Association between baseline plasma leptin levels and subsequent development of diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Care* 1999;22(1):65-70.
619. Sanchez-Margalef V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 2003;133(1):11-9.
620. Aren G, Sepet E, Ozdemir D, Dinccag N, Guvener B, Firatli E. Periodontal health, salivary status, and metabolic control in children with type I diabetes mellitus. *J Periodontol* 2003;74(12):1789-95.
621. Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 2010;53:138-53.
622. Emingil G, Darcan S, Keskinoglu A, Kutukculer N, Atilla G. Localized aggressive periodontitis in a patient with type I diabetes mellitus: a case report. *J Periodontol* 2001;72(9):1265-70.
623. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62(2):123-31.
624. Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 1999;22(2):345-54.
625. Diamond J. The double puzzle of diabetes. *Nature* 2003;423(6940):599-602.
626. Bian L, Hanson RL, Muller YL, Ma L, Kobes S, Knowler WC, et al. Variants in ACAD10 are associated with type 2 diabetes, insulin resistance and lipid oxidation in Pima Indians. *Diabetologia* 2010;53(7):1349-53.
627. Sandberg GE, Sundberg HE, Fjellstrom CA, Wikblad KF. Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50(1):27-34.
628. Luczaj-Cepowicz E, Marczuk-Kolada G, Waszkiel D. Evaluation of periodontal status in young patients with insulin-dependent diabetes mellitus (type I). *Adv Med Sci* 2006;51 Suppl 1:134-7.
629. Lalla E, Cheng B, Lal S, Tucker S, Greenberg E, Goland R, et al. Periodontal changes in children and adolescents with diabetes: a case-control study. *Diabetes Care* 2006;29(2):295-9.
630. Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc* 1982;104(5):653-60.
631. Firatli E, Yilmaz O, Onan U. The relationship between clinical attachment loss and the duration of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in children and adolescents. *J Clin Periodontol* 1996;23(4):362-6.
632. Novaes AB, Jr., Pereira AL, de Moraes N, Novaes AB. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. *J Periodontol* 1991;62(2):116-22.
633. Ringelberg ML, Dixon DO, Francis AO, Plummer RW. Comparison of gingival health and gingival crevicular fluid flow in children with and without diabetes. *J Dent Res* 1977;56(2):108-11.
634. Dakovic D, Pavlovic MD. Periodontal disease in children and adolescents with type I diabetes in Serbia. *J Periodontol* 2008;79(6):987-92.
635. Lalla E, Cheng B, Lal S, Kaplan S, Softness B, Greenberg E, et al. Diabetes-related parameters and periodontal conditions in children. *J Periodontol Res* 2007;42(4):345-9.
636. Siudikiene J, Maciulskiene V, Nedzelskiene I. Dietary and oral hygiene habits in children with type I diabetes mellitus related to dental caries. *Stomatologija* 2005;7(2):58-62.
637. Pinson M, Hoffman WH, Garnick JJ, Litaker MS. Periodontal disease and type I diabetes mellitus in children and adolescents. *J Clin Periodontol* 1995;22(2):118-23.
638. Gusberti FA, Syed SA, Bacon G, Grossman N, Loesche WJ. Puberty gingivitis in insulin-dependent diabetic children. I. Cross-sectional observations. *J Periodontol* 1983;54(12):714-20.
639. Mathewson RJ, Primosch RE. *Fundamentals of Pediatric Dentistry*, 3rd Edition ed. Chicago: Quintessence; 1995.
640. Ainamo J, Lahtinen A, Uitto VJ. Rapid periodontal destruction in adult humans with poorly controlled diabetes. A report of 2 cases. *J Clin Periodontol* 1990;17(1):22-8.
641. Vemillo AT. Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2003;134 Spec No:245-335.
642. Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23(1):3-13.

643. Darre L, Vergnes JN, Gourdy P, Sixou M. Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: A meta-analysis of interventional studies. *Diabetes Metab* 2008;34(5):497-506.
644. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis* 2008;14(3):191-203.
645. Perrino MA. Diabetes and periodontal disease: an example of an oral/systemic relationship. *N Y State Dent J* 2007;73(5):38-41.
646. Teeuw WJ, Gerdes VE, Loos BG. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2010;33(2):421-7.
647. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2006;77(4):591-8.
648. Grossi SG, Skrepicinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, et al. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol* 1997;68(8):713-9.
649. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res* 2005;84(12):1154-9.
650. Taylor GW. The effects of periodontal treatment on diabetes. *J Am Dent Assoc* 2003;134 Spec No:41S-48S.
651. Thorstensson H, Kuylenstierna J, Hugoson A. Medical status and complications in relation to periodontal disease experience in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol* 1996;23(3 Pt 1):194-202.
652. Tervonen T, Lamminsalo S, Hiltunen L, Raunio T, Knuutila M. Resolution of periodontal inflammation does not guarantee improved glycemic control in type I diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2009;36(1):51-7.
653. Llambes F, Silvestre FJ, Hernandez-Mijares A, Guiha R, Caffesse R. The effect of periodontal treatment on metabolic control of type I diabetes mellitus. *Clin Oral Investig* 2008;12(4):337-43.
654. McMullen JA, Van Dyke TE, Horoszewicz HU, Genco RJ. Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus. *J Periodontol* 1981;52(4):167-73.
655. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 2004;75(9):1203-8.
656. Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, Jialal I. Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- α and β . *Diabetes* 2005;54(1):85-91.
657. Frantzis TG, Reeve CM, Brown AL, Jr. The ultrastructure of capillary basement membranes in the attached gingiva of diabetic and nondiabetic patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1971;42(7):406-11.
658. Listgarten MA, Ricker FH, Jr, Laster L, Shapiro J, Cohen DW. Vascular basement lamina thickness in the normal and inflamed gingiva of diabetics and non-diabetics. *J Periodontol* 1974;45(9):676-84.
659. Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type I diabetes mellitus. *Arch Oral Biol* 2006;51(8):640-8.
660. Golub LM, Schneir M, Ramamurthy NS. Enhanced collagenase activity in diabetic rat gingiva: in vitro and in vivo evidence. *J Dent Res* 1978;57(3):520-5.
661. Kaplan R, Mulvihill J, Ramamurthy N, L. G. Gingival collagen metabolism in human diabetics. *J Dent Res* 1982;61:275.
662. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Advanced non-enzymatic tissue glycosylation: significance in late diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 1989;7 Suppl 1:S103-8.
663. Rønningen KS, Enersen M. Diabetes and oral health. *Norsk Epidemiologi* 2012;22(1):47-53.
664. Gumus P, Buduneli N, Cetinkalp S, Hawkins SI, Renaud D, Kinane DF, et al. Salivary antioxidants in patients with type I or 2 diabetes and inflammatory periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol* 2009;80(9):1440-6.
665. Cutler CW, Shinedling EA, Nunn M, Jotwani R, Kim BO, Nares S, et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol* 1999;70(12):1429-34.
666. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol* 2000;71(8):1375-84.
667. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol* 2001;6(1):125-37.
668. Novaes AB, Jr., Gonzalez Gutierrez F, Grisi MF, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part II--Microbiological analysis using the BANA test. *Braz Dent J* 1997;8(1):27-33.
669. Finney LS, Finney MO, Gonzalez-Campoy JM. What the mouth has to say about diabetes. Careful examinations can avert serious complications. *Postgrad Med* 1997;102(6):117-26.
670. Tervonen T, Karjalainen K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type I diabetes. *J Clin Periodontol* 1997;24(7):505-10.
671. Unal T, Firatli E, Sivas A, Meric H, Oz H. Fructosamine as a possible monitoring parameter in non-insulin dependent diabetes mellitus patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1993;64(3):191-4.
672. Firatli E, Unal T, Saka N, Onan U, Sivas A, Oz H. Serum fructosamine correlates with gingival index in children with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *J Clin Periodontol* 1994;21(8):565-8.
673. Gislen G, Nilsson KO, Matsson L. Gingival inflammation in diabetic children related to degree of metabolic control. *Acta Odontol Scand* 1980;38(4):241-6.
674. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4(1):1-6.
675. Meyle J, Gonzales JR. Influences of systemic diseases on periodontitis in children and adolescents. *Periodontol* 2000;26:92-112.
676. Sastrowijoto SH, van der Velden U, van Steenberghe TJ, Hillemans P, Hart AA, de Graaff J, et al. Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival microbiology in insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective study. *J Clin Periodontol* 1990;17(4):233-42.
677. Hugoson A, Thorstensson H, Falk H, Kuylenstierna J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol* 1989;16(4):215-23.
678. Glavind L, Lund B, Loe H. The relationship between periodontal state and diabetes duration, insulin dosage and retinal changes. *J Periodontol* 1968;39(6):341-7.
679. Novaes AB, Jr., Silva MA, Batista EL, Jr., dos Anjos BA, Novaes AB, Pereira AL. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. A 10-year follow-up study. *J Periodontol* 1997;68(4):328-34.
680. Ervasti T, Knuutila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol* 1985;56(3):154-7.
681. Rylander H, Ramberg P, Blohme G, Lindhe J. Prevalence of periodontal disease in young diabetics. *J Clin Periodontol* 1987;14(1):38-43.
682. Aldridge JP, Lester V, Watts TL, Collins A, Viberti G, Wilson RF. Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in type I diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1995;22(4):271-5.
683. Al-Shammari KF, Al-Ansari JM, Moussa NM, Ben-Nakhi A, Al-Arouj M, Wang HL. Association of periodontal disease severity with diabetes duration and diabetic complications in patients with type I diabetes mellitus. *J Int Acad Periodontol* 2006;8(4):109-14.
684. Rosenthal IM, Abrams H, Kopczyk A. The relationship of inflammatory periodontal disease to diabetic status in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Periodontol* 1988;15(7):425-9.
685. Nelson RG. Periodontal disease and diabetes. *Oral Dis* 2008;14(3):204-5.

686. Barnett ML, Baker RL, Yancey JM, MacMillan DR, Kotoyan M. Absence of periodontitis in a population of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. *J Periodontol* 1984;55(7):402-5.
687. Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem* 2004;261(1-2):137-42.
688. Murrah VA. Diabetes mellitus and associated oral manifestations: a review. *J Oral Pathol* 1985;14(4):271-81.
689. Wegner H. Dental caries in young diabetics. *Caries Res* 1971;5(2):188-92.
690. Marder MZ, Abelson DC, Mandel ID. Salivary alterations in diabetes mellitus. *J Periodontol* 1975;46(9):567-9.
691. Ciancio SG, Golub LM, Mosovich L, Katz C, Kleinberg I. Urea levels in the gingival crevices of diabetic and normal adolescents. *J Dent Res* 1977;56(10):1144.
692. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2001;28(9):860-4.
693. Gonzalez S, Lobos I, Guajardo A, Celis A, Zemelman R, Smith CT, et al. Yeasts in juvenile periodontitis. Preliminary observations by scanning electron microscopy. *J Periodontol* 1987;58(2):119-24.
694. Hannula J, Dogan B, Slots J, Okte E, Asikainen S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(2):113-8.
695. Belazi M, Velegraki A, Fleva A, Gidarakou I, Papanau L, Baka D, et al. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses* 2005;48(3):192-6.
696. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis* 2004;10(2):106-12.
697. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol* 2008;46(8):783-93.
698. Javed F, Kingspor L, Sundin U, Altamash M, Klinge B, Engstrom PE. Periodontal conditions, oral *Candida albicans* and salivary proteins in type 2 diabetic subjects with emphasis on gender. *BMC Oral Health* 2009;9:12.
699. Bacic M, Plancak D, Granic M. CPITN assessment of periodontal disease in diabetic patients. *J Periodontol* 1988;59(12):816-22.
700. Tervonen T, Knuutila M, Pohjamo L, Nurkkala H. Immediate response to nonsurgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1991;18(1):65-8.
701. Alpagot T, Silverman S, Lundergan W, Bell C, Chambers DW. Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *J Periodontol Res* 2001;36(3):169-74.
702. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol* 1996;67(11):185-92.
703. Oliver RC, Tervonen T. Periodontitis and tooth loss: comparing diabetics with the general population. *J Am Dent Assoc* 1993;124(12):71-6.
704. Oliver RC, Tervonen T, Flynn DG, Keenan KM. Enzyme activity in crevicular fluid in relation to metabolic control of diabetes and other periodontal risk factors. *J Periodontol* 1993;64(5):358-62.
705. Campbell MJ. Epidemiology of periodontal disease in the diabetic and the non-diabetic. *Aust Dent J* 1972;17(4):274-8.
706. Sznajder N, Carraro JJ, Rugna S, Sereday M. Periodontal findings in diabetic and nondiabetic patients. *J Periodontol* 1978;49(9):445-8.
707. Tervonen T, Knuutila M. Relation of diabetes control to periodontal pocketing and alveolar bone level. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986;61(4):346-9.
708. Boyko EL, BA. Infection and Diabetes. In: Group. NDD, Health, Nlo, Diseases. NloDaDaK, editors. *Diabetes in America*. 2nd Edition ed. Bethesda: NIH Publication; 1995. p. 485-500.
709. Vazquez JA, Sobel JD. Fungal infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am* 1995;9(1):97-116.
710. Shah BR, Hux JE. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(2):510-3.
711. For the dental patient. Diabetes: tips for good oral health. *J Am Dent Assoc* 2010;141(7):926.
712. Shahgoli S, Shapiro R, Best JA. A dentoalveolar abscess in a pediatric patient with ketoacidosis caused by occult diabetes mellitus: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88(2):164-6.
713. Eibl N, Spatz M, Fischer GF, Mayr WR, Samstag A, Wolf HM, et al. Impaired primary immune response in type-1 diabetes: results from a controlled vaccination study. *Clin Immunol* 2002;103(3 Pt 1):249-59.
714. Rubinstein R, Genaro AM, Motta A, Cremaschi G, Wald MR. Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice. Involvement of high glucose. *Clin Exp Immunol* 2008;154(2):235-46.
715. Spatz M, Eibl N, Hink S, Wolf HM, Fischer GF, Mayr WR, et al. Impaired primary immune response in type-1 diabetes. Functional impairment at the level of APCs and T-cells. *Cell Immunol* 2003;221(1):15-26.
716. Muller LM, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AI, et al. Increased risk of common infections in patients with type I and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis* 2005;41(3):281-8.
717. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias C, Smith H. Infection and diabetes: the case for glucose control. *Am J Med* 1982;72(3):439-50.
718. Mazade MA, Edwards MS. Impairment of type III group B *Streptococcus*-stimulated superoxide production and opsonophagocytosis by neutrophils in diabetes. *Mol Genet Metab* 2001;73(3):259-67.
719. Beam TR, Jr., Crigler ED, Goldman JK, Schiffman G. Antibody response to polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine in diabetics. *JAMA* 1980;244(23):2621-4.
720. Li Volti S, Caruso-Nicoletti M, Biazzo F, Sciacca A, Mandara G, Mancuso M, et al. Hyporesponsiveness to intradermal administration of hepatitis B vaccine in insulin dependent diabetes mellitus. *Arch Dis Child* 1998;78(1):54-7.
721. Plouffe JF, Silva J, Jr., Fekety R, Allen JL. Cell-mediated immunity in diabetes mellitus. *Infect Immun* 1978;21(2):425-9.
722. Moutschen MP, Scheen AJ, Lefebvre PJ. Impaired immune responses in diabetes mellitus: analysis of the factors and mechanisms involved. Relevance to the increased susceptibility of diabetic patients to specific infections. *Diabete Metab* 1992;18(3):187-201.
723. Vergani D, Johnston C, N BA, Barnett AH. Low serum C4 concentrations: an inherited predisposition to insulin dependent diabetes? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;286(6369):926-8.
724. Zargar AH, Shah NA, Masoodi SR, Laway BA, Dar FA, Khan AR, et al. Copper, zinc, and magnesium levels in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Postgrad Med J* 1998;74(877):665-8.
725. Caseiro A, Ferreira R, Padrao A, Quintaneiro C, Pereira A, Marinheiro R, et al. Salivary Proteome and Peptidome Profiling in Type I Diabetes Mellitus Using a Quantitative Approach. *J Proteome Res* 2013.
726. Cabras T, Pisano E, Mastinu A, Denotti G, Pusceddu PP, Inzitari R, et al. Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type I diabetes. *Mol Cell Proteomics* 2010.
727. Zhang Q, Fillmore TL, Schepmoes AA, Clauss TR, Gritsenko MA, Mueller PW, et al. Serum proteomics reveals systemic dysregulation of innate immunity in type I diabetes. *J Exp Med* 2013;210(1):191-203.
728. Sammalkorpi K. Glucose intolerance in acute infections. *J Intern Med* 1989;225(1):15-9.
729. Yki-Jarvinen H, Sammalkorpi K, Koivisto VA, Nikkila EA. Severity, duration, and mechanisms of insulin resistance during acute infections. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69(2):317-23.
730. Samaranyake LP, Macfarlane TW. *Oral Candidosis*. London: Wright-Butterworth; 1990.

731. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranyake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* 2008;14(7):582-90.
732. Hauman CH, Thompson IO, Theunissen F, Wolfaardt P. Oral carriage of *Candida* in healthy and HIV-seropositive persons. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(5):570-2.
733. Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(2):189-93.
734. Samaranyake YH, Samaranyake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol* 1994;41(5):295-310.
735. Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ. Oral candidal carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. *Diabet Med* 1999;16(8):675-9.
736. Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, Coleman DC, Hayes JR, Bell PM, et al. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *J Oral Pathol Med* 2000;29(2):86-90.
737. Gottfredsson M, Cox GM, Indridason OS, de Almeida GM, Heald AE, Perfect JR. Association of plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA and oropharyngeal *Candida* colonization. *J Infect Dis* 1999;180(2):534-7.
738. Guggenheimer J, Moore PA, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: II. Prevalence and characteristics of *Candida* and Candidal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89(5):570-6.
739. Axell T, Samaranyake LP, Reichart PA, Olsen I. A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;84(2):111-2.
740. Silverman S, Eversole L, Truelove E. *Essentials of oral medicine*. London: BC Decker Inc; 2001.
741. Wamakulasuriya KA, Samaranyake LP, Peiris JS. Angular cheilitis in a group of Sri Lankan adults: a clinical and microbiologic study. *J Oral Pathol Med* 1991;20(4):172-5.
742. Kadir T, Uygun B, Akyuz S. Prevalence of *Candida* species in Turkish children: relationship between dietary intake and carriage. *Arch Oral Biol* 2005;50(1):33-7.
743. Jenkins WM, Macfarlane TW, Ferguson MM, Mason DK. Nutritional deficiency in oral candidosis. *Int J Oral Surg* 1977;6(4):204-10.
744. Samaranyake LP. Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol* 1986;15(2):61-5.
745. Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2246-54.
746. Berdicevsky I, Ben-Aryeh H, Szargel R, Gutman D. Oral *Candida* in children. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984;57(1):37-40.
747. Manning DJ, Coughlin RP, Poskitt EM. *Candida* in mouth or on dummy? *Arch Dis Child* 1985;60(4):381-2.
748. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* 1980;25(1):1-10.
749. Wachtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* 2011;6(2):e17046.
750. Darwazeh AM, al-Bashir A. Oral candidal flora in healthy infants. *J Oral Pathol Med* 1995;24(8):361-4.
751. Jabra-Rizk MA, Torres SR, Rambob I, Meiller TF, Grossman LK, Minah G. Prevalence of oral *Candida* species in a North American pediatric population. *J Clin Pediatr Dent* 2007;31(4):260-3.
752. Russell C, Lay KM. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. *Arch Oral Biol* 1973;18(8):957-62.
753. Qi QG, Hu T, Zhou XD. Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different age in China. *J Oral Pathol Med* 2005;34(6):352-6.
754. Clayton YM, Noble WC. Observations on the epidemiology of *Candida albicans*. *J Clin Pathol* 1966;19(1):76-8.
755. Hannula J, Saarela M, Jousimies-Somer H, Takala A, Syrjänen R, Kononen E, et al. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14(3):176-82.
756. Mattos-Graner RO, de Moraes AB, Rontani RM, Birman EG. Relation of oral yeast infection in Brazilian infants and use of a pacifier. *ASDC J Dent Child* 2001;68(1):33-6, 10.
757. Zollner MS, Jorge AO. *Candida* spp. occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and breasts. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(2):151-5.
758. Goldman AS. Human milk, leukocytes, and immunity. *J Pediatr* 1977;90(1):167-8.
759. Vudhichamnong K, Walker DM, Ryley HC. The effect of secretory immunoglobulin A on the in-vitro adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. *Arch Oral Biol* 1982;27(8):617-21.
760. Ersin NK, Eronat N, Cogulu D, Uzel A, Aksit S. Association of maternal-child characteristics as a factor in early childhood caries and salivary bacterial counts. *J Dent Child (Chic)* 2006;73(2):105-11.
761. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res* 2010;44(3):272-6.
762. Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Domann E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(5):302-8.
763. d'Enfert C. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol* 2009;12(4):358-64.
764. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galvan B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the "Candida score" for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2009;37(5):1624-33.
765. Samaranyake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(2):171-80.
766. Ellepola AN, Samaranyake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis* 2001;7(1):11-7.
767. Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully C, et al. Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(1):44-9.
768. Bartholomew GA, Rodu B, Bell DS. Oral candidiasis in patients with diabetes mellitus: a thorough analysis. *Diabetes Care* 1987;10(5):607-12.
769. Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, Stender H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):4138-41.
770. Oliveira MA, Carvalho LP, Gomes Mde S, Bacellar O, Barros TF, Carvalho EM. Microbiological and immunological features of oral candidiasis. *Microbiol Immunol* 2007;51(8):713-9.
771. Xu J, Mitchell TG. Geographical differences in human oral yeast flora. *Clin Infect Dis* 2003;36(2):221-4.
772. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Jr., Enwonwu CO, Onwujekwe DI, Jr., Merz WG, Meiller TF. Prevalence of yeast among children in Nigeria and the United States. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(6):383-5.
773. Bai KY, Reddy CD, Abu-Talib SH. Oral candidal carriage in young insulin dependent diabetics. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 1995;13(1):20-3.
774. Darwazeh AM, MacFarlane TW, McCuish A, Lamey PJ. Mixed salivary glucose levels and candidal carriage in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol Med* 1991;20(6):280-3.
775. Fisher BM, Lamey PJ, Samaranyake LP, MacFarlane TW, Frier BM. Carriage of *Candida* species in the oral cavity in diabetic patients: relationship to glycaemic control. *J Oral Pathol* 1987;16(5):282-4.
776. Tapper-Jones LM, Aldred MJ, Walker DM, Hayes TM. Candidal infections and populations of *Candida albicans* in mouths of diabetics. *J Clin Pathol* 1981;34(7):706-11.

777. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(3):181-5.
778. Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-I diabetes mellitus patients. *Mycoses* 2004;47(7):315-8.
779. Goncalves RH, Miranda ET, Zaia JE, Giannini MJ. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients. *Mycopathologia* 2006;162(2):83-9.
780. Peters RB, Bahn AN, Barends G. *Candida albicans* in the oral cavities of diabetics. *J Dent Res* 1966;45(3):771-7.
781. Kumar BV, Padshetty NS, Bai KY, Rao MS. Prevalence of *Candida* in the oral cavity of diabetic subjects. *J Assoc Physicians India* 2005;53:599-602.
782. Zegarelli DJ. Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngol Clin North Am* 1993;26(6):1069-89.
783. Fongsmut T, Deerochanawong C, Prachyabrued W. Intraoral candida in Thai diabetes patients. *J Med Assoc Thai* 1998;81(6):449-53.
784. Krishnan PA. Fungal infections of the oral mucosa. *Indian J Dent Res* 2012;23(5):650-9.
785. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002;2(2):73-85.
786. Sendid B, Cotteau A, Francois N, D'Haveloose A, Standaert A, Camus D, et al. *Candidaemia* and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* 2006;6:80.
787. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(1):133-63.
788. Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Goncalves RB, Hofling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. *Arch Oral Biol* 2008;53(12):1172-8.
789. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 2011;19(5):241-7.
790. Samaranyake LP, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. *Arch Oral Biol* 1982;27(10):869-73.
791. Willis AM, Coulter WA, Hayes JR, Bell P, Lamey PJ. Factors affecting the adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells of insulin-using diabetes mellitus patients. *J Med Microbiol* 2000;49(3):291-3.
792. Quirino MR, Birman EG, Paula CR. Oral manifestations of diabetes mellitus in controlled and uncontrolled patients. *Braz Dent J* 1995;6(2):131-6.
793. Hill LV, Tan MH, Pereira LH, Embil JA. Association of oral candidiasis with diabetic control. *J Clin Pathol* 1989;42(5):502-5.
794. Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1996;25(8):411-5.
795. Kumar S, Joshi KR, Mathur JS, Mathur DR. A study of germ-tube formation by *Candida Albicans* in biological fluids of diabetic patients. *Indian J Pathol Microbiol* 1980;23(1):45-9.
796. McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect Immun* 1981;32(3):1234-41.
797. Critchley IA, Douglas LJ. Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1987;133(3):637-43.
798. Tronchin G, Bouchara JP, Robert R, Senet JM. Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infect Immun* 1988;56(8):1987-93.
799. Knight L, Fletcher J. Growth of *Candida albicans* in saliva: stimulation by glucose associated with antibiotics, corticosteroids, and diabetes mellitus. *J Infect Dis* 1971;123(4):371-7.
800. Samaranyake LP, MacFarlane TW. The effect of dietary carbohydrates on the in-vitro adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells. *J Med Microbiol* 1982;15(4):511-7.
801. Ohman SC, Jontell M. Treatment of angular cheilitis. The significance of microbial analysis, antimicrobial treatment, and interfering factors. *Acta Odontol Scand* 1988;46(5):267-72.
802. Russell C, Jones JH. Effects of oral inoculation of *Candida albicans* in tetracycline-treated rats. *J Med Microbiol* 1973;6(3):275-9.
803. Fletcher J, Mather J, Lewis MJ, Whiting G. Mouth lesions in iron-deficient anemia: relationship to *Candida albicans* in saliva and to impairment of lymphocyte transformation. *J Infect Dis* 1975;131(1):44-50.
804. Yeh CK, Dodds MW, Zuo P, Johnson DA. A population-based study of salivary lysozyme concentrations and candidal counts. *Arch Oral Biol* 1997;42(1):25-31.
805. Lin AL, Johnson DA, Patterson TF, Wu Y, Lu DL, Shi Q, et al. Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV-infected cohort. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(5):270-8.
806. Komiyama EY, Ribeiro PM, Junqueira JC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Prevalence of yeasts in the oral cavity of children treated with inhaled corticosteroids. *Braz Oral Res* 2004;18(3):197-201.
807. Nikawa H, Egusa H, Makihiro S, Okamoto T, Kurihara H, Shiba H, et al. An in vitro evaluation of the adhesion of *Candida* species to oral and lung tissue cells. *Mycoses* 2006;49(1):14-7.
808. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2011.
809. Davis DA. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr Opin Microbiol* 2009;12(4):365-70.
810. Rautema R, Ramage G. Oral candidosis—clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol* 2011;37(4):328-36.
811. Thein ZM, Samaranyake YH, Samaranyake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol* 2007;52(8):761-7.
812. Odds FC. *Candida* infections: an overview. *Crit Rev Microbiol* 1987;15(1):1-5.
813. Rosa EA, Rached RN, Ignacio SA, Rosa RT, Jose da Silva W, Yau JY, et al. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. *J Med Microbiol* 2008;57(Pt 10):1277-81.
814. Jamieson DJ, Stephen DW, Terriere EC. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 1996;138(1):83-8.
815. Siqueira JF, Jr., Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(5):632-41.
816. Biswas SK, Chaffin WL. Anaerobic growth of *Candida albicans* does not support biofilm formation under similar conditions used for aerobic biofilm. *Curr Microbiol* 2005;51(2):100-4.
817. Buchner T, Fegeler W, Bernhardt H, Brockmeyer N, Duswald KH, Herrmann M, et al. Treatment of severe *Candida* infections in high-risk patients in Germany: consensus formed by a panel of interdisciplinary investigators. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21(5):337-52.
818. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, et al. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 2004;38(2):161-89.
819. Hoppe JE, Frey P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(3):188-91.
820. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother* 2008;61 Suppl 1:i7-12.
821. Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis* 2005;41(10):1455-60.

822. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter SR. Analysis of the strain relatedness of oral *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus using polymerase chain reaction-fingerprinting. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21(6):353-9.
823. Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med* 1990;19(3):119-25.
824. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* 1992;172(8):305-12.
825. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(2):197-212.
826. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res* 2010;89(10):1016-23.
827. Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:355-405.
828. Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J* 1990;169(3-4):96-8.
829. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001;85(2):162-9.
830. Levine MJ. Development of artificial salivas. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(3-4):279-86.
831. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol* 1982;11(1):1-17.
832. Takeda I, Stretch C, Barnaby P, Bhatnager K, Rankin K, Fu H, et al. Understanding the human salivary metabolome. *NMR Biomed* 2009;22(6):577-84.
833. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007;383(1-2):30-40.
834. Chicharro JL, Lucia A, Perez M, Vaquero AF, Urena R. Saliva composition and exercise. *Sports Med* 1998;26(1):17-27.
835. Nagler RM, Hershkovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ. Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. *J Investig Med* 2002;50(3):214-25.
836. Yamaguchi M, Takada R, Kambe S, Hatakeyama T, Naitoh K, Yamazaki K, et al. Evaluation of time-course changes of gingival crevicular fluid glucose levels in diabetics. *Biomed Microdevices* 2005;7(1):53-8.
837. Crossner CG. Salivary flow rate in children and adolescents. *Swed Dent J* 1984;8(6):271-6.
838. Tukiä-Kulmala H, Tenovuori J. Intra- and inter-individual variation in salivary flow rate, buffer effect, lactobacilli, and mutans streptococci among 11- to 12-year-old schoolchildren. *Acta Odontol Scand* 1993;51(1):31-7.
839. Kavanagh DA, O'Mullane DM, Smeeton N. Variation of salivary flow rate in adolescents. *Arch Oral Biol* 1998;43(5):347-52.
840. Leonor SP, Laura SM, Esther IC, Marco ZZ, Enrique AG, Ignacio MR. Stimulated saliva flow rate patterns in children: A six-year longitudinal study. *Arch Oral Biol* 2009;54(10):970-5.
841. Torres SR, Nucci M, Milanos E, Pereira RP, Massaud A, Munhoz T. Variations of salivary flow rates in Brazilian school children. *Braz Oral Res* 2006;20(1):8-12.
842. Bjornstad L, Crossner CG. Stimulated salivary flow rate and buffer effect in schoolchildren from Greenland and Sweden: a comparative study. *Acta Odontol Scand* 2007;65(3):162-6.
843. Andersson R, Arvidsson E, Crossner CG, Holm AK, Mansson B. The flow rate, pH and buffer effect of mixed saliva in children. *J Int Assoc Dent Child* 1974;5(1):5-12.
844. Heintze U, Birkhed D, Bjorn H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J* 1983;7(6):227-38.
845. Inoue H, Ono K, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, Yokota M, et al. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Arch Oral Biol* 2006;51(12):1055-60.
846. Birkhed DH, U. Salivary secretion rate, buffer capacity, and pH. In: Tenovuori JO, editor. *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*. 1st ed: CRC Press, Inc.; 1989. p. 25-74.
847. Navazesh M, Brightman VJ, Pogoda JM. Relationship of medical status, medications, and salivary flow rates in adults of different ages. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;81(2):172-6.
848. Norderfors T. Xerostomia and hyposalivation. *Adv Dent Res* 2000;14:48-56.
849. Sreebny LM, Valdin A, Yu A. Xerostomia. Part II: Relationship to nonoral symptoms, drugs, and diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;68(4):419-27.
850. Wu AJ, Ship JA. A characterization of major salivary gland flow rates in the presence of medications and systemic diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(3):301-6.
851. Sreebny LM. Salivary flow in health and disease. *Compend Suppl* 1989(13):S461-9.
852. Soderling E, Pienihakkinen K, Alanen ML, Hietaoja M, Alanen P. Salivary flow rate, buffer effect, sodium, and amylase in adolescents: a longitudinal study. *Scand J Dent Res* 1993;101(2):98-102.
853. Bretz WA, do Valle EV, Jacobson JJ, Marchi F, Mendes S, Nor JE, et al. Unstimulated salivary flow rates of young children. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(5):541-5.
854. Dawes C, Kubieniec K. The effects of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 2004;49(8):665-9.
855. Stookey GK. The effect of saliva on dental caries. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:11S-17S.
856. Stephan RM. Intra-oral hydrogen ion concentrations associated with dental caries activity. *J Dent Res* 1944;23:257.
857. Rudney JD. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6(4):343-67.
858. Dawes C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res* 1987;66 Spec No:648-53.
859. Dawes C. A mathematical model of salivary clearance of sugar from the oral cavity. *Caries Res* 1983;17(4):321-34.
860. von Bultzingslowen I, Sollecito TP, Fox PC, Daniels T, Jonsson R, Lockhart PB, et al. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103 Suppl:S57 e1-15.
861. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc* 1989;119(2):298-304.
862. Navazesh M, Mulligan RA, Kipnis V, Denny PA, Denny PC. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. *J Dent Res* 1992;71(6):1275-8.
863. Denny PC, Denny PA, Klausner DK, Hong SH, Navazesh M, Tabak LA. Age-related changes in mucins from human whole saliva. *J Dent Res* 1991;70(10):1320-7.
864. Aguirre A, Testa-Weintraub LA, Banderas JA, Haraszthy GG, Reddy MS, Levine MJ. Sialochemistry: a diagnostic tool? *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(3-4):343-50.
865. Llena-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(5):E449-55.
866. Mandel ID. Impact of saliva on dental caries. *Compend Suppl* 1989(13):S476-81.
867. Mandel ID. A contemporary view of salivary research. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(3-4):599-604.
868. Wei GX, Campagna AN, Bobek LA. Factors affecting antimicrobial activity of MUC7 12-mer, a human salivary mucin-derived peptide. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007;6:14.
869. Hay DI, Smith DJ, Schluckebier SK, Moreno EC. Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *J Dent Res* 1984;63(6):857-63.
870. Messenger B, Clifford MN, Morgan LM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like immunoreactivity in saliva following sham-fed and swallowed meals. *J Endocrinol* 2003;177(3):407-12.

871. Actis AB, Perovic NR, Defago D, Beccacece C, Eynard AR. Fatty acid profile of human saliva: a possible indicator of dietary fat intake. *Arch Oral Biol* 2005;50(1):1-6.
872. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICS* 2011;15(6):353-61.
873. Dawes C, Tsang RW, Suelzle T. The effects of gum chewing, four oral hygiene procedures, and two saliva collection techniques, on the output of bacteria into human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2001;46(7):625-32.
874. Ghezzi EM, Lange LA, Ship JA. Determination of variation of stimulated salivary flow rates. *J Dent Res* 2000;79(11):1874-8.
875. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010;6(1):78-95.
876. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis* 2011;17(4):345-54.
877. Tenovuo J. Antimicrobial agents in saliva—protection for the whole body. *J Dent Res* 2002;81(12):807-9.
878. Bertram HC, Eggers N, Eller N. Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification. *Anal Chem* 2009;81(21):9188-93.
879. Li Y, Denny P, Ho CM, Montemagno C, Shi W, Qi F, et al. The Oral Fluid MEMS/NEMS Chip (OFMNC): diagnostic and translational applications. *Adv Dent Res* 2005;18(1):3-5.
880. Totan A, Greabu M, Totan C, Spinu T. Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? *Clin Chem Lab Med* 2006;44(5):612-5.
881. Christodoulides N, Mohanty S, Miller CS, Langub MC, Floriano PN, Dharshan P, et al. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip* 2005;5(3):261-9.
882. Miller CS, King CP, Jr., Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 2006;137(3):322-9.
883. Silwood CJ, Lynch E, Claxson AW, Grootveld MC. ¹H and (¹³C) NMR spectroscopic analysis of human saliva. *J Dent Res* 2002;81(6):422-7.
884. Slavkin HC. Toward molecularly based diagnostics for the oral cavity. *J Am Dent Assoc* 1998;129(8):1138-43.
885. Surdacka A, Ciezka E, Piorunski-Stolzmann M, Wender-Ozegowska E, Korybalska K, Kawka E, et al. Relation of salivary antioxidant status and cytokine levels to clinical parameters of oral health in pregnant women with diabetes. *Arch Oral Biol* 2010.
886. Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. Concomitant analysis of salivary tumor markers—a new diagnostic tool for oral cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):3979-84.
887. Drake RR, Cazare LH, Semmes OJ, Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5(1):93-100.
888. Loeb LM, Naffah-Mazzacoratti MG, Porcionatto MA, Martins JR, Kouyoumdjian M, Weckx LM, et al. Chondroitin sulfate and kallikrein in saliva: markers for glossodynia. *Int Immunopharmacol* 2008;8(7):1056-8.
889. Hu S, Yu T, Xie Y, Yang Y, Li Y, Zhou X, et al. Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. *Cancer Genomics Proteomics* 2007;4(2):55-64.
890. Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res* 2009;8(1):239-45.
891. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Pfeifer M, Rose A, Thigpen JT. CA 15-3 and c-erbB-2 presence in the saliva of women. *Clin Oral Investig* 1999;3(3):138-43.
892. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, Thigpen JT. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2363-70.
893. Streckfus C, Bigler L, Tucci M, Thigpen JT. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Invest* 2000;18(2):101-9.
894. Streckfus CF, Bigler LR, Zwick M. The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study. *J Oral Pathol Med* 2006;35(5):292-300.
895. Malamud D. Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: a technology whose time has come. *Am J Med* 1997;102(4A):9-14.
896. Castagnola M, Messana I, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Morelli A, et al. Hypo-phosphorylation of salivary peptidome as a clue to the molecular pathogenesis of autism spectrum disorders. *J Proteome Res* 2008;7(12):5327-32.
897. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis* 2002;8(2):69-76.
898. Caporossi L, Santoro A, Papaleo B. Saliva as an analytical matrix: state of the art and application for biomonitoring. *Biomarkers* 2010;15(6):475-87.
899. Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands JL, Schanstra JP, Coon JJ, et al. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res* 2007;6(12):4549-55.
900. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 2007;4(4):531-8.
901. Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res* 2009;12(3):206-11.
902. Tiberti C, Shashaj B, Verrienti A, Vecchi EG, Lucantoni F, Masotti D, et al. GAD and IA-2 autoantibody detection in type 1 diabetic patient saliva. *Clin Immunol* 2009;131(2):271-6.
903. Todd AL, Ng WY, Lee YS, Loke KY, Thai AC. Evidence of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in oral fluid of type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;57(3):171-7.
904. Issaq HJ, Van QN, Waybright TJ, Muschik GM, Veenstra TD. Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *J Sep Sci* 2009;32(13):2183-99.
905. Schmidt CW. Metabolomics: What's happening downstream of DNA. *Environmental Health Perspectives* 2004;112(7):410-15.
906. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29(11):1181-9.
907. German JB, Hammock BD, Watkins SM. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics* 2005;1(1):3-9.
908. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat Med* 2002;8(12):1439-44.
909. Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4(7):551-61.
910. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res* 2009;15(2):431-40.
911. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 2007;35(Database issue):D521-6.
912. Walsh MC, Brennan L, Malthouse JP, Roche HM, Gibney MJ. Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2006;84(3):531-9.
913. Gu H, Pan Z, Xi B, Hainline BE, Shanaiah N, Asiago V, et al. ¹H NMR metabolomics study of age profiling in children. *NMR Biomed* 2009;22(8):826-33.

914. Gowda GA, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8(5):617-33.
915. Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, Tammela J, et al. Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabolomics. *Int J Cancer* 2005;113(5):782-8.
916. Oresic M, Simell S, Sysi-Aho M, Nanto-Salonen K, Seppanen-Laakso T, Panikka V, et al. Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med* 2008;205(13):2975-84.
917. Lindon JCN, J.K. Holmes, E. The Handbook of Metabolomics and Metabolomics. 1st ed. Oxford: Elsevier; 2007.
918. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabolomics in pharmaceutical R&D. *FEBS J* 2007;274(5):1140-51.
919. Bertram HC, Malmendal A, Petersen BO, Madsen JC, Pedersen H, Nielsen NC, et al. Effect of magnetic field strength on NMR-based metabolomic human urine data. Comparative study of 250, 400, 500, and 800 MHz. *Anal Chem* 2007;79(18):7110-5.
920. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabolomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm Res* 2006;23(6):1075-88.
921. Ramadan Z, Jacobs D, Grigorov M, Kochhar S. Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms. *Talanta* 2006;68(5):1683-91.
922. Nicholson JK, Wilson ID. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(8):668-76.
923. Dunn WB, Bailey NJ, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 2005;130(5):606-25.
924. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 2007;26(1):51-78.
925. Buchholz A, Hurlbaeus J, Wandrey C, Takors R. Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol Eng* 2002;19(1):5-15.
926. Patti GJ, Yanos O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(4):263-9.
927. Griffin JL, Vidal-Puig A. Current challenges in metabolomics for diabetes research: a vital functional genomic tool or just a ploy for gaining funding? *Physiol Genomics* 2008;34(1):1-5.
928. Zhang S, Nagana Gowda GA, Asiago V, Shanaiah N, Barbas C, Raftery D. Correlative and quantitative ¹H NMR-based metabolomics reveals specific metabolic pathway disturbances in diabetic rats. *Anal Biochem* 2008;383(1):76-84.
929. Yoon MS, Jankowski V, Montag S, Zidek WW, Henning L, Schluter H, et al. Characterisation of advanced glycation endproducts in saliva from patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323(2):377-81.
930. Harada H, Shimizu H, Maeiwa M. ¹H-NMR of human saliva. An application of NMR spectroscopy in forensic science. *Forensic Sci Int* 1987;34(3):189-95.
931. Yamada-Nosaka A, Fukutomi S, Uemura S, Hashida T, Fujishita M, Kobayashi Y, et al. Preliminary nuclear magnetic resonance studies on human saliva. *Arch Oral Biol* 1991;36(9):697-701.
932. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2(11):2692-703.
933. Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc* 2006;137(3):313-21.
934. Mandel ID. Salivary diagnosis: more than a lick and a promise. *J Am Dent Assoc* 1993;124(1):85-7.
935. Ernstgard L. Influence of gender on the metabolism of alcohols in human saliva in vitro. *Arch Oral Biol* 2009;54(8):737-42.
936. Grootveld M, Silwood CJ, Lynch E. High resolution ¹H NMR investigations of the oxidative consumption of salivary biomolecules by ozone: relevance to the therapeutic applications of this agent in clinical dentistry. *Biofactors* 2006;27(1-4):5-18.
937. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *BMJ* 1992;305(6847):207-8.
938. Wahlander A, Mohr S, Paumgartner G. Assessment of hepatic function. Comparison of caffeine clearance in serum and saliva during the day and at night. *J Hepatol* 1990;10(2):129-37.
939. Takahashi N, Washio J, Mayanagi G. Metabolomics of supragingival plaque and oral bacteria. *J Dent Res* 2010;89(12):1383-8.
940. Sharon A, Ben-Aryeh H, Itzhak B, Yoram K, Szargel R, Gutman D. Salivary composition in diabetic patients. *J Oral Med* 1985;40(1):23-6.
941. Vasconcelos AC, Soares MS, Almeida PC, Soares TC. Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. *J Oral Sci* 2010;52(2):293-8.
942. Moreira AR, Passos IA, Sampaio FC, Soares MS, Oliveira RJ. Flow rate, pH and calcium concentration of saliva of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 2009;42(8):707-11.
943. Harrison R, Bowen WH. Flow rate and organic constituents of whole saliva in insulin-dependent diabetic children and adolescents. *Pediatr Dent* 1987;9(4):287-91.
944. Thorstensson H, Falk H, Hugoson A, Olsson J. Some salivary factors in insulin-dependent diabetics. *Acta Odontol Scand* 1989;47(3):175-83.
945. Ben-Aryeh H, Cohen M, Kanter Y, Szargel R, Laufer D. Salivary composition in diabetic patients. *J Diabet Complications* 1988;2(2):96-9.
946. Ben-Aryeh H, Serouya R, Kanter Y, Szargel R, Laufer D. Oral health and salivary composition in diabetic patients. *J Diabetes Complications* 1993;7(1):57-62.
947. Rai K, Hegde AM, Kamath A, Shetty S. Dental caries and salivary alterations in Type 1 Diabetes. *J Clin Pediatr Dent* 2011;36(2):181-4.
948. Sreebny LM, Yu A, Green A, Valdin A. Xerostomia in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1992;15(7):900-4.
949. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gomez de Ferraris ME, Peydro A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(4):E309-14.
950. Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, Ship JA. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89(3):305-11.
951. Soares MS, Batista-Filho MM, Pimentel MJ, Passos IA, Chimenos-Kustner E. Determination of salivary glucose in healthy adults. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14(10):e510-3.
952. Busato IM, Ignacio SA, Brancher JA, Gregio AM, Machado MA, Azevedo-Alanis LR. Impact of xerostomia on the quality of life of adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(3):376-82.
953. Reuterving CO, Reuterving G, Hagg E, Ericson T. Salivary flow rate and salivary glucose concentration in patients with diabetes mellitus influence of severity of diabetes. *Diabete Metab* 1987;13(4):457-62.
954. Tenovuo J, Lehtonen OP, 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(1):62-6.
955. Karjalainen KM, Knuutila ML, Kaar ML. Salivary factors in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Pediatr Dent* 1996;18(4):306-11.
956. Ivanovski K, Naumovski V, Kostadinova M, Pesevska S, Drijanska K, Filipce V. Xerostomia and salivary levels of glucose and urea in patients with diabetes. *Prilozi* 2012;33(2):219-29.
957. Hagewald SJ, Fishel DL, Christan CE, Bemimoulin JP, Kage A. Salivary IgA in response to periodontal treatment. *Eur J Oral Sci* 2003;111(3):203-8.
958. Dodds MW, Dodds AP. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83(4):465-70.
959. Panchbhai AS, Degwekar SS, Bhowte RR. Estimation of salivary glucose, salivary amylase, salivary total protein and salivary flow rate in diabetics in India. *J Oral Sci* 2010;52(3):359-68.

960. Jin Y, Yip HK. Supragingival calculus: formation and control. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(5):426-41.
961. Jurysta C, Bulur N, Oguzhan B, Satman I, Yilmaz TM, Malaisse WJ, et al. Salivary glucose concentration and excretion in normal and diabetic subjects. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009:430426.
962. Aydin S. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *J Biochem Mol Biol* 2007;40(1):29-35.
963. Forbat LN, Collins RE, Maskell GK, Sonksen PH. Glucose concentrations in parotid fluid and venous blood of patients attending a diabetic clinic. *J R Soc Med* 1981;74(10):725-8.
964. Ship JA. Diabetes and oral health: an overview. *J Am Dent Assoc* 2003;134 Spec No:45-105.
965. Odds FC, Evans EG, Taylor MA, Wales JK. Prevalence of pathogenic yeasts and humoral antibodies to candida in diabetic patients. *J Clin Pathol* 1978;31(9):840-4.
966. Chavez EM, Borrell LN, Taylor GW, Ship JA. A longitudinal analysis of salivary flow in control subjects and older adults with type 2 diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(2):166-73.
967. Hase JC, Birkhed D. Salivary glucose clearance, dry mouth and pH changes in dental plaque in man. *Arch Oral Biol* 1988;33(12):875-80.
968. Ziskin DES, E.H. Loughlin, W.C. Diabetes in relation to certain oral and systemic problems. Part I: clinical study of dental caries, tooth eruption, gingival changes, growth phenomena and related observations in juveniles. *J Dent Res* 1944;23:317-31.
969. Lal S, Cheng B, Kaplan S, Softness B, Greenberg E, Goland RS, et al. Accelerated tooth eruption in children with diabetes mellitus. *Pediatrics* 2008;121(5):e1139-43.
970. Adler P, Wegner H, Bohatka L. Influence of age and duration of diabetes on dental development in diabetic children. *J Dent Res* 1973;52(3):535-7.
971. Bohatka L, Wegner H, Adler P. Parameters of the mixed dentition in diabetic children. *J Dent Res* 1973;52(1):131-5.
972. Marks SC, Jr, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec* 1996;245(2):374-93.
973. Luan X, Ito Y, Holliday S, Walker C, Daniel J, Galang TM, et al. Extracellular matrix-mediated tissue remodeling following axial movement of teeth. *J Histochem Cytochem* 2007;55(2):127-40.
974. Symons AL, Weerakoon A, Marks SC, Jr. Growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I immunoreactivity in osteoclast-like cells during tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat following treatment with colony-stimulating factor-1. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003;13(2-4):195-204.
975. Hartsfield JK, Jr. Premature exfoliation of teeth in childhood and adolescence. *Adv Pediatr* 1994;41:453-70.
976. McDonald REA, D. R. Dean, J.A. Dentistry for the Child and Adolescent. 8th ed ed. St Louis, MO: Mosby; 2004.
977. Hilgers KK, Akridge M, Scheetz JP, Kinane DE. Childhood obesity and dental development. *Pediatr Dent* 2006;28(1):18-22.
978. Boyce HW, Bakheet MR. Sialorrhea: a review of a vexing, often unrecognized sign of oropharyngeal and esophageal disease. *J Clin Gastroenterol* 2005;39(2):89-97.
979. Gibson J, Lamey PJ, Lewis M, Frier B. Oral manifestations of previously undiagnosed non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Oral Pathol Med* 1990;19(6):284-7.
980. Russotto SB. Asymptomatic parotid gland enlargement in diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;52(6):594-8.
981. Løe HG, RJ. Oral complications in Diabetes. In: Aubert R, editor. *Diabetes in America*. 2nd ed: National Diabetes Data Group 1995; 1995.
982. Carda C, Carranza M, Arriaga A, Diaz A, Peydro A, Gomez de Ferraris ME. Structural differences between alcoholic and diabetic parotid sialosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10(4):309-14.
983. Lalla RV, D'Ambrosio JA. Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2001;132(10):1425-32.
984. Musumeci V, Cherubini P, Zuppi C, Zappacosta B, Ghirlanda G, Di Salvo S. Aminotransferases and lactate dehydrogenase in saliva of diabetic patients. *J Oral Pathol Med* 1993;22(2):73-6.
985. Cinquini I, Calisti L, Fierabracci V, Marrapese E, Egea JC, Masiello P, et al. Enzymatic markers of salivary cell injury in saliva of type I diabetic children. *Clin Oral Investig* 2002;6(1):21-3.
986. Zaleska A, Knas M, Kuzniak A, Waszkiewicz IN, Niczyponuk M, Waszkiel D, et al. Salivary innate defense system in type I diabetes mellitus in children with mixed and permanent dentition. *Acta Odontol Scand* 2013.
987. van den Broek AM, Feenstra L, de Baat C. A review of the current literature on aetiology and measurement methods of halitosis. *J Dent* 2007;35(8):627-35.
988. Cortelli JR, Barbosa MD, Westphal MA. Halitosis: a review of associated factors and therapeutic approach. *Braz Oral Res* 2008;22 Suppl 1:44-54.
989. Feller L, Blignaut E. Halitosis: a review. *SADJ* 2005;60(1):17-9.
990. Novak BJ, Blake DR, Meinardi S, Rowland FS, Pontello A, Cooper DM, et al. Exhaled methyl nitrate as a noninvasive marker of hyperglycemia in type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(40):15613-8.
991. Lee J, Ngo J, Blake D, Meinardi S, Pontello AM, Newcomb R, et al. Improved predictive models for plasma glucose estimation from multi-linear regression analysis of exhaled volatile organic compounds. *J Appl Physiol* 2009;107(1):155-60.
992. Migliario M, Rimondini L. Oral and non oral diseases and conditions associated with bad breath. *Minerva Stomatol* 2011;60(3):105-15.
993. Calli C, Liberato FL, Pereira AC, de Castro Meneghim M, Goodson JM, Groppo FC. The relationship between volatile sulphur compounds, tongue coating and periodontal disease. *Int J Dent Hyg* 2009;7(4):251-5.
994. Nalcaci R, Sonmez IS. Evaluation of oral malodor in children. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106(3):384-8.
995. Candelli M, Rigante D, Marietti G, Nista EC, Crea F, Bartolozzi F, et al. *Helicobacter pylori*, gastrointestinal symptoms, and metabolic control in young type I diabetes mellitus patients. *Pediatrics* 2003;111(4 Pt 1):800-3.
996. McNamara TF, Alexander JF, Lee M. The role of microorganisms in the production of oral malodor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;34(1):41-8.
997. Kleinberg I, Westbay G. Oral malodor. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990;1(4):247-59.
998. Seemann R, Kison A, Bizhang M, Zimmer S. Effectiveness of mechanical tongue cleaning on oral levels of volatile sulfur compounds. *J Am Dent Assoc* 2001;132(9):1263-7; quiz 318.
999. Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Shimazaki Y, Yoneda M, Hirofuji T, et al. Relationship between oral malodor and the global composition of indigenous bacterial populations in saliva. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(9):2806-14.
1000. Burket LW, Sindoni A, Jr. Diabetes and the dental patient. *J Am Dent Assoc* 1959;58(2):81-5.
1001. Shatzman AR, Henkin RI. Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(6):3867-71.
1002. Perros P, MacFarlane TW, Counsell C, Frier BM. Altered taste sensation in newly-diagnosed NIDDM. *Diabetes Care* 1996;19(7):768-70.
1003. Le Floch JP, Le Lievre G, Sadoun J, Perlemuter L, Peynegre R, Hazard J. Taste impairment and related factors in type I diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1989;12(3):173-8.
1004. Ahola AJ, Mikkilä V, Makimattila S, Forsblom C, Freese R, Groop PH. Energy and nutrient intakes and adherence to dietary guidelines among Finnish adults with type I diabetes. *Ann Med* 2010.
1005. Thomas MC, Moran J, Forsblom C, Harjutsalo V, Thorn L, Ahola A, et al. The Association Between Dietary Sodium Intake, ESRD, and All-Cause Mortality In Patients With Type I Diabetes. *Diabetes Care* 2011.

1006. Ekinci EI, Clarke S, Thomas MC, Moran JL, Cheong K, Macisaac RJ, et al. Dietary salt intake and mortality in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34(3):703-9.
1007. Dangore-Khasbage SB, Degwekar SS, Bhowate RR, Motwani MB, Indurkar AD, Lohe VK, et al. Comparative evaluation of gustatory function between postmenopausal women and age-matched men. *Oral Dis* 2010;16(5):469-75.
1008. Cibirka RM, Nelson SK, Lefebvre CA. Burning mouth syndrome: a review of etiologies. *J Prosthet Dent* 1997;78(1):93-7.
1009. Maresky LS, van der Bijl P, Gird I. Burning mouth syndrome. Evaluation of multiple variables among 85 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;75(3):303-7.
1010. Zilli C, Brooke RI, Lau CL, Merskey H. Screening for psychiatric illness in patients with oral dysesthesia by means of the General Health Questionnaire—twenty-eight item version (GHQ-28) and the Irritability, Depression and Anxiety Scale (IDA). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;67(4):384-9.
1011. Bergdahl J, Anneroth G. Burning mouth syndrome: literature review and model for research and management. *J Oral Pathol Med* 1993;22(10):433-8.
1012. Tourne LP, Friction JR. Burning mouth syndrome. Critical review and proposed clinical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74(2):158-67.
1013. Almeida AG, M.T. Síndrome de ardor bucal: Controvérsias e realidades. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac* 2004;45:85-103.
1014. Scala A, Checchi L, Montevicchi M, Manini I, Giamberardino MA. Update on burning mouth syndrome: overview and patient management. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(4):275-91.
1015. Woda A, Pionchon P. A unified concept of idiopathic orofacial pain: pathophysiologic features. *J Orofac Pain* 2000;14(3):196-212.
1016. Rhodus NL, Carlson CR, Miller CS. Burning mouth (syndrome) disorder. *Quintessence Int* 2003;34(8):587-93.
1017. Collin HL, Niskanen L, Uusitupa M, Toyry J, Collin P, Koivisto AM, et al. Oral symptoms and signs in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. A focus on diabetic neuropathy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90(3):299-305.
1018. Forssell H, Jaaskelainen S, Tenovu O, Hinkka S. Sensory dysfunction in burning mouth syndrome. *Pain* 2002;99(1-2):41-7.
1019. Hershkovich O, Nagler RM. Biochemical analysis of saliva and taste acuity evaluation in patients with burning mouth syndrome, xerostomia and/or gustatory disturbances. *Arch Oral Biol* 2004;49(7):515-22.
1020. Suarez P, Clark GT. Burning mouth syndrome: an update on diagnosis and treatment methods. *J Calif Dent Assoc* 2006;34(8):611-22.
1021. Basker RM, Sturdee DW, Davenport JC. Patients with burning mouths. A clinical investigation of causative factors, including the climacteric and diabetes. *Br Dent J* 1978;145(1):9-16.
1022. Carrington J, Getter L, Brown RS. Diabetic neuropathy masquerading as glossodynia. *J Am Dent Assoc* 2001;132(11):1549-51.
1023. Lamey PJ, Lamb AB. Prospective study of aetiological factors in burning mouth syndrome. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296(6631):1243-6.
1024. Hatch CL. Glossodynia as an oral manifestation of diabetes mellitus. *Ear Nose Throat J* 1989;68(10):782-5.
1025. Goss AN. Sore tongue. *N Z Dent J* 1973;69(317):194-201.
1026. Bergdahl M, Bergdahl J. Burning mouth syndrome: prevalence and associated factors. *J Oral Pathol Med* 1999;28(8):350-4.
1027. Huang WW, Rothe MJ, Grant-Kels JM. The burning mouth syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1996;34(1):91-8.
1028. Wardrop RW, Hailes J, Burger H, Reade PC. Oral discomfort at menopause. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;67(5):535-40.
1029. Costa CC, Resende GB, Souza JM, Tavares SS, Almeida IC, Filho LC. [Study of the oral manifestations in diabetic children and their correlation variables]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48(3):374-8.
1030. Petrou-Amerikanou C, Markopoulos AK, Belazi M, Karamitsos D, Papanayotou P. Prevalence of oral lichen planus in diabetes mellitus according to the type of diabetes. *Oral Dis* 1998;4(1):37-40.
1031. Van Dis ML, Parks ET. Prevalence of oral lichen planus in patients with diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79(6):696-700.
1032. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod* 2009;35(1):60-2.
1033. Yeh CK, Harris SE, Mohan S, Horn D, Fajardo R, Chun YH, et al. Hyperglycemia and xerostomia are key determinants of tooth decay in type 1 diabetic mice. *Lab Invest* 2012;92(6):868-82.
1034. Fouad AF. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ* 2003;67(4):459-67.
1035. Mangos JA. The uptake of sugars by isolated rat parotid acinar cells. *J Dent Res* 1979;58(5):1465-70.
1036. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis* 2004;10(4):187-200.
1037. Halldin MU, Tylleskar K, Hagenas L, Tuvemo T, Gustafsson J. Is growth hormone hypersecretion in diabetic adolescent girls also a daytime problem? *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48(6):785-94.
1038. Naughton MJ, Ruggiero AM, Lawrence JM, Imperatore G, Klingensmith GJ, Waitzfelder B, et al. Health-related quality of life of children and adolescents with type 1 or type 2 diabetes mellitus: SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008;162(7):649-57.
1039. Blanz BJ, Rensch-Riemann BS, Fritz-Sigmund DI, Schmidt MH. IDDM is a risk factor for adolescent psychiatric disorders. *Diabetes Care* 1993;16(12):1579-87.
1040. Hassan K, Loar R, Anderson BJ, Heptulla RA. The role of socioeconomic status, depression, quality of life, and glycemic control in type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr* 2006;149(4):526-31.
1041. Guttman-Bauman I, Flaherty BP, Strugger M, McEvoy RC. Metabolic control and quality-of-life self-assessment in adolescents with IDDM. *Diabetes Care* 1998;21(6):915-8.
1042. Moore PA, Orchard T, Guggenheimer J, Weyant RJ. Diabetes and oral health promotion: a survey of disease prevention behaviors. *J Am Dent Assoc* 2000;131(9):1333-41.
1043. White BA LS. Dental utilization and cost among diabetics in an HMO. *J Dent Res* 1998;77:653.
1044. Thorstensson H, Falk H, Hugoson A, Kuylensstierna J. Dental care habits and knowledge of oral health in insulin-dependent diabetics. *Scand J Dent Res* 1989;97(3):207-15.
1045. Koerber A, Peters KE, Kaste LM, Lopez E, Noorullah K, Torres I, et al. The views of dentists, nurses and nutritionists on the association between diabetes and periodontal disease: a qualitative study in a Latino community. *J Public Health Dent* 2006;66(3):212-5.
1046. Standards of medical care in diabetes--2008. *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 1:S12-54.
1047. Mealey BL. The interactions between physicians and dentists in managing the care of patients with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:4S-7S.
1048. Bjelland S, Bray P, Gupta N, Hirscht R. Dentists, diabetes and periodontitis. *Aust Dent J* 2002;47(3):202-7; quiz 72.
1049. DePaola LG, Kutcher MJ, Bowers GM. The dentist's role in the detection of the undiagnosed diabetic patient. *Compend Contin Educ Dent* 1984;5(3):187-8, 90-2, 95.
1050. Bell GW, Large DM, Barclay SC. Oral health care in diabetes mellitus. *SADJ* 2000;55(3):158-65; quiz 75.
1051. Al-Habashneh R, Barghout N, Humbert L, Khader Y, Alwaeli H. Diabetes and oral health: doctors' knowledge, perception and practices. *J Eval Clin Pract* 2010;16(5):976-80.
1052. Mealey BL. Periodontal implications: medically compromised patients. *Ann Periodontol* 1996;1(1):256-321.
1053. Borrell LN, Kunzel C, Lamster I, Lalla E. Diabetes in the dental office: using NHANES III to estimate the probability of undiagnosed disease. *J Periodontol Res* 2007;42(6):559-65.

1054. Lalla E, Kunzel C, Burkett S, Cheng B, Lamster IB. Identification of unrecognized diabetes and pre-diabetes in a dental setting. *J Dent Res* 2011;90(7):855-60.
1055. Mattson JS, Ceruti DR. Diabetes mellitus: a review of the literature and dental implications. *Compend Contin Educ Dent* 2001;22(9):757-60, 62, 64 passim; quiz 73.
1056. Selwitz RH, Pihlstrom BL. How to lower risk of developing diabetes and its complications: recommendations for the patient. *J Am Dent Assoc* 2003;134 Spec No:545-585.
1057. Alves C, Andion J, Brandao M, Menezes R. [Pathogenic aspects of the periodontal disease associated to diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51(7):1050-7.
1058. Moore PA, Zgibor JC, Dasanayake AP. Diabetes: a growing epidemic of all ages. *J Am Dent Assoc* 2003;134 Spec No:115-155.
1059. Moore PA, Weyant RJ, Etzel KR, Guggenheimer J, Mongelluzzo MB, Myers DE, et al. Type 1 diabetes mellitus and oral health: assessment of coronal and root caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2001;29(3):183-94.
1060. Moursi AM, Fernandez JB, Daronch M, Zee L, Jones CL. Nutrition and oral health considerations in children with special health care needs: implications for oral health care providers. *Pediatr Dent* 2010;32(4):333-42.
1061. Mobley CC. Lifestyle interventions for "diabetes": the state of the science. *Compend Contin Educ Dent* 2004;25(3):207-8, 11-2, 14-8; quiz 20.
1062. Verbeeten KC, Elks CE, Daneman D, Ong KK. Association between childhood obesity and subsequent Type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2011;28(1):10-8.
1063. Viner RM, Hindmarsh PC, Taylor B, Cole TJ. Childhood body mass index (BMI), breastfeeding and risk of Type 1 diabetes: findings from a longitudinal national birth cohort. *Diabet Med* 2008;25(9):1056-61.
1064. Mealey BL. Impact of advances in diabetes care on dental treatment of the diabetic patient. *Compend Contin Educ Dent* 1998;19(1):41-4, 46-8, 50 passim; quiz 60.
1065. Sheridan P. Diabetes and oral health. *J Am Dent Assoc* 1987;115(5):741-2.
1066. Golden SH, Peart-Vigilance C, Kao WH, Brancati FL. Perioperative glycemic control and the risk of infectious complications in a cohort of adults with diabetes. *Diabetes Care* 1999;22(9):1408-14.
1067. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998;12(2):12-26.
1068. Bensch L, Braem M, Van Acker K, Willems G. Orthodontic treatment considerations in patients with diabetes mellitus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;123(1):74-8.
1069. Burden D, Mullally B, Sandler J. Orthodontic treatment of patients with medical disorders. *Eur J Orthod* 2001;23(4):363-72.
1070. Bensch L, Braem M, Willems G. Orthodontic considerations in the diabetic patient. *Semin Orthod* 2004;10:252-58.
1071. Maia L, Monini, A, Jacob, H, Gandini Jr L. Maxillary ulceration resulting from using a rapid maxillary expander in a diabetic patient. *Angle Orthodontist* 2011;81(3):546-50.
1072. El-Bialy T, Aboul-Azm SF, El-Sakhawy M. Study of craniofacial morphology and skeletal maturation in juvenile diabetics (Type I). *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2000;118(2):189-95.
1073. Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, Plotnick L, Kaufman F, Laffel L, et al. Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005;28(1):186-212.
1074. DGS. Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais. In: Oral DGdS-PNdPdS, editor. Lisboa: Ministério da Saúde; 2008. p. 126.
1075. Cadavid AS, Lince CM, Jaramillo MC. Dental caries in the primary dentition of a Colombian population according to the ICDAS criteria. *Braz Oral Res* 2010;24(2):211-6.
1076. WHO. World Health Organization: A guide to oral health epidemiological investigation. Geneva; 1979.
1077. WHO. Oral Health Surveys: Basic Methods. 4th ed. Geneva; 1997.
1078. Kitasako Y, Moritsuka M, Foxton RM, Ikeda M, Tagami J, Nomura S. Simplified and quantitative saliva buffer capacity test using a hand-held pH meter. *Am J Dent* 2005;18(3):147-50.
1079. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49 Pt 1:329-37.
1080. Paulo C, Mourao C, Veiga PM, Marques JM, Rocha G, Alves AF, et al. Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Med Mycol* 2009;1-10.
1081. Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature* 1949;163:688.
1082. Rodrigues F, Foster D, Caramelo F, Serranho P, Goncalves G, Januario L, et al. Progressive changes in pneumococcal carriage in children attending daycare in Portugal after 6 years of gradual conjugate vaccine introduction show falls in most residual vaccine serotypes but no net replacement or trends in diversity. *Vaccine* 2012;30(26):3951-6.
1083. Gan MJ, Albanese-O'Neill A, Haller MJ. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2012;42(10):269-91.
1084. Stancescu DE, Lord K, Lipman TH. The epidemiology of type 1 diabetes in children. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012;41(4):679-94.
1085. Hassan GA, Sliem HA, Ellethy AT, Salama Mel S. Role of immune system modulation in prevention of type 1 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab* 2012;16(6):904-9.
1086. Gyurus EK, Patterson C, Soltesz G. Twenty-one years of prospective incidence of childhood type 1 diabetes in Hungary - the rising trend continues (or peaks and highlands?). *Pediatr Diabetes* 2011.
1087. Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;18(4):248-51.
1088. Ludvigsson J, Holmqvist BM, Samuelsson U. Does modern high standard life style cause Type 1 diabetes in children? *Diabetes Metab Res Rev* 2012.
1089. Knip M. Pathogenesis of type 1 diabetes: implications for incidence trends. *Horm Res Paediatr* 2011;76 Suppl 1:57-64.
1090. Fagulha AS, I. Grupo de Estudos da Diabetes mellitus. Controlo glicémico e tratamento da diabetes tipo 1 da criança e adolescente em Portugal. *Acta Med Port* 2004;17:173-79.
1091. Greening L, Stoppelbein L, Konishi C, Jordan SS, Moll G. Child routines and youths' adherence to treatment for type 1 diabetes. *J Pediatr Psychol* 2007;32(4):437-47.
1092. Helgeson VS, Siminerio L, Escobar O, Becker D. Predictors of metabolic control among adolescents with diabetes: a 4-year longitudinal study. *J Pediatr Psychol* 2009;34(3):254-70.
1093. Helgeson VS, Snyder PR, Seltman H, Escobar O, Becker D, Siminerio L. Brief report: trajectories of glycemic control over early to middle adolescence. *J Pediatr Psychol* 2010;35(10):1161-7.
1094. Nardi L, Zucchini S, D'Alborton F, Salardi S, Maltoni G, Bisacchi N, et al. Quality of life, psychological adjustment and metabolic control in youths with type 1 diabetes: a study with self- and parent-report questionnaires. *Pediatr Diabetes* 2008;9(5):496-503.
1095. Levine BS, Anderson BJ, Butler DA, Antisdell JE, Brackett J, Laffel LM. Predictors of glycemic control and short-term adverse outcomes in youth with type 1 diabetes. *J Pediatr* 2001;139(2):197-203.
1096. Abolfotouh MA, Kamal MM, El-Bourgy MD, Mohamed SG. Quality of life and glycemic control in adolescents with type 1 diabetes and the impact of an education intervention. *Int J Gen Med* 2011;4:141-52.

1097. Tahirovic H, Toromanovic A. Glycemic control in diabetic children: role of mother's knowledge and socioeconomic status. *Eur J Pediatr* 2010;169(8):961-4.
1098. Frindik JP, Williams JP, Johnson RL, Dykman RA. Parental perception and factors associated with glycemic control in pediatric patients with type 1 diabetes. *Endocr Pract* 2002;8(2):105-8.
1099. Stallwood L. Relationship between caregiver knowledge and socioeconomic factors on glycemic outcomes of young children with diabetes. *J Spec Pediatr Nurs* 2006;11(3):158-65.
1100. Hassan K, Heptulla RA. Glycemic control in pediatric type 1 diabetes: role of caregiver literacy. *Pediatrics* 2010;125(5):e1104-8.
1101. Weinstein P, Harrison R, Benton T. Motivating parents to prevent caries in their young children: one-year findings. *J Am Dent Assoc* 2004;135(6):731-8.
1102. Grindefjord M, Dahllof G, Nilsson B, Modeer T. Prediction of dental caries development in 1-year-old children. *Caries Res* 1995;29(5):343-8.
1103. Tagliaferro EP, Pereira AC, Meneghim Mde C, Ambrosano GM. Assessment of dental caries predictors in a seven-year longitudinal study. *J Public Health Dent* 2006;66(3):169-73.
1104. Rovner AJ, Nansel TR. Are children with type 1 diabetes consuming a healthful diet?: a review of the current evidence and strategies for dietary change. *Diabetes Educ* 2009;35(1):97-107.
1105. Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 1:S48-65.
1106. Patton SR, Dolan LM, Powers SW. Mealtime interactions relate to dietary adherence and glycemic control in young children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(5):1002-6.
1107. Patton SR, Dolan LM, Powers SW. Differences in family mealtime interactions between young children with type 1 diabetes and controls: implications for behavioral intervention. *J Pediatr Psychol* 2008;33(8):885-93.
1108. Mayer-Davis EJ, Nichols M, Liese AD, Bell RA, Dabelea DM, Johansen JM, et al. Dietary intake among youth with diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *J Am Diet Assoc* 2006;106(5):689-97.
1109. Patton SR. Adherence to diet in youth with type 1 diabetes. *J Am Diet Assoc* 2011;111(4):550-5.
1110. Munoz KA, Krebs-Smith SM, Ballard-Barbash R, Cleveland LE. Food intakes of US children and adolescents compared with recommendations. *Pediatrics* 1997;100(3 Pt 1):323-9.
1111. Guenther PM, Dodd KW, Reedy J, Krebs-Smith SM. Most Americans eat much less than recommended amounts of fruits and vegetables. *J Am Diet Assoc* 2006;106(9):1371-9.
1112. Standards of medical care in diabetes--2007. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 1:S4-S41.
1113. Mehta SN, Volkeneing LK, Anderson BJ, Nansel T, Weissberg-Benchell J, Wysocki T, et al. Dietary behaviors predict glycemic control in youth with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2008;31(7):1318-20.
1114. Alves C, Brandao M, Andion J, Menezes R. Oral health knowledge and habits in children with type 1 diabetes mellitus. *Braz Dent J* 2009;20(1):70-3.
1115. Conner S, Iranpour B, Mills J. Alteration in parotid salivary flow in diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970;30(1):55-9.
1116. Meurman JH, Collin HL, Niskanen L, Toiry J, Alakujala P, Keinänen S, et al. Saliva in non-insulin-dependent diabetic patients and control subjects: The role of the autonomic nervous system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86(1):69-76.
1117. Bentley C, Crawford JJ, Broderius CA. Analytical and physiological variability of salivary microbial counts. *J Dent Res* 1988;67(11):1409-13.
1118. Schlagenhaut U, Pommerencke K, Weiger R. Influence of toothbrushing, eating and smoking on Dentocult SM Strip mutans test scores. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10(2):98-101.
1119. Carlsson J. Effect of diet on presence of *Streptococcus salivarius* in dental plaque and saliva. *Odontol Revy* 1965;16(4):336-47.
1120. Birkhed D, Edwardsson S, Andersson H. Comparison among a dip-slide test (Dentocult), plate count, and Snyder test for estimating number of lactobacilli in human saliva. *J Dent Res* 1981;60(11):1832-41.
1121. Ben-Aryeh H, Fisher M, Szargel R, Laufer D. Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age. *Arch Oral Biol* 1990;35(11):929-31.
1122. Ben-Aryeh H, Miron D, Szargel R, Gutman D. Whole-saliva secretion rates in old and young healthy subjects. *J Dent Res* 1984;63(9):1147-8.
1123. Hamison R, Bowen WH. Periodontal health, dental caries, and metabolic control in insulin-dependent diabetic children and adolescents. *Pediatr Dent* 1987;9(4):283-6.
1124. Borgnakke WS. Salivary glucose levels are unable to predict oral candidiasis or monitor diabetes. *J Evid Based Dent Pract* 2010;10(4):237-40.
1125. Marchetti P, Tognarelli M, Giannarelli R, Grossi C, Picaro L, di Carlo A, et al. Decreased salivary glucose secretory rate: usefulness for detection of diabetic patients with autonomic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1989;7(3):181-6.
1126. Soderling E. Practical aspects of salivary analyses. In: Tenovuo JO, editor. *Human saliva: clinical chemistry and microbiology* 1st ed: CRC Press, Inc.; 1989.
1127. Navazesh M, Christensen C, Brightman V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res* 1992;71(7):1363-9.
1128. Dodds MW, Hsieh SC, Johnson DA. The effect of increased mastication by daily gum-chewing on salivary gland output and dental plaque acidogenicity. *J Dent Res* 1991;70(12):1474-8.
1129. Nishanian P, Aziz N, Chung J, Detels R, Fahey JL. Oral fluids as an alternative to serum for measurement of markers of immune activation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(4):507-12.
1130. Dasanayake AP, Caufield PW, Cutter GR, Roseman JM, Kohler B. Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods. *Arch Oral Biol* 1995;40(4):345-51.
1131. Nurkka A, Obiero J, Kayhty H, Scott JA. Effects of sample collection and storage methods on antipneumococcal immunoglobulin A in saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(3):357-61.
1132. Ollila PS, Larmas MA. Long-term predictive value of salivary microbial diagnostic tests in children. *Eur Arch Paediatr Dent* 2008;9(1):25-30.
1133. Togelius J, Kristoffersson K, Anderson H, Bratthall D. Streptococcus mutans in saliva: intraindividual variations and relation to the number of colonized sites. *Acta Odontol Scand* 1984;42(3):157-63.
1134. Karjalainen S, Karjalainen M, Forrester D. Physiologic variation of sucrase activity and microbial counts in human saliva. *Scand J Dent Res* 1992;100(2):111-6.
1135. Matula C, Hildebrandt M, Nahler G. Decontamination of the oral cavity. Effect of six local anti-microbial preparations in comparison to water and parafilm as controls. *J Int Med Res* 1988;16(2):98-106.
1136. Fine DH, Baumhammers A. Effect of water pressure irrigation on stainable material on the teeth. *J Periodontol* 1970;41(8):468-72.
1137. Wikner S. Short term effect of mechanical plaque control on salivary concentration of *S. mutans* and lactobacilli. *Scand J Dent Res* 1986;94(4):320-6.
1138. Kjellman O. Secretion rate and buffering action of whole mixed saliva in subjects with insulin-treated diabetes mellitus. *Odontol Revy* 1970;21(2):159-68.
1139. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to Streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(2):108-25.
1140. Seki M, Karakama F, Ozaki T, Yamashita Y. An improved method for detecting mutans streptococci using a commercial kit. *J Oral Sci* 2002;44(3-4):135-9.

1141. Aguilera Galaviz LA, Premoli G, Gonzalez A, Rodriguez RA. Caries risk in children: determined by levels of mutans streptococci and Lactobacillus. *J Clin Pediatr Dent* 2005;29(4):329-33.
1142. Larmas M. A new dip-slide method for the counting of salivary lactobacilli. *Proc Finn Dent Soc* 1975;71(2):31-35.
1143. Alaluusua S, Savolainen J, Tuompo H, Gronroos L. Slide-scoring method for estimation of Streptococcus mutans levels in saliva. *Scand J Dent Res* 1984;92(2):127-33.
1144. Jensen B, Bratthall D. A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva. *J Dent Res* 1989;68(3):468-71.
1145. Thibodeau EA, O'Sullivan DM. Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. *Community Dent Oral Epidemiol* 1996;24(3):164-8.
1146. Larmas M. Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. *Int Dent J* 1992;42(4):199-208.
1147. Jurgensen N, Petersen PE. Oral health and the impact of socio-behavioural factors in a cross sectional survey of 12-year old school children in Laos. *BMC Oral Health* 2009;9:29.
1148. Ostberg AL, Halling A, Lindblad U. Gender differences in knowledge, attitude, behavior and perceived oral health among adolescents. *Acta Odontol Scand* 1999;57(4):231-6.
1149. Pakpour AH, Hidarnia A, Hajizadeh E, Kumar S, Harrison AP. The status of dental caries and related factors in a sample of Iranian adolescents. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16(6):e822-7.
1150. Young DA. New caries detection technologies and modern caries management: merging the strategies. *Gen Dent* 2002;50(4):320-31.
1151. Pitts NB. Modern concepts of caries measurement. *J Dent Res* 2004;83 Spec No C:C43-7.
1152. Nyvad B, Fejerskov O. Active root surface caries converted into inactive caries as a response to oral hygiene. *Scand J Dent Res* 1986;94(3):281-4.
1153. Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Res* 1999;33(4):252-60.
1154. Spencer AJ, Lewis J. The relationships between prevalence of caries, percentage with active caries, and caries severity. *Aust Dent J* 1987;32(6):441-5.
1155. Ten Cate JM LM, Pearce ELF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Fejerskov O KE, editor. *Dental caries: the disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 49-69.
1156. ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. Characterization and validation of diagnostic methods. *Monogr Oral Sci* 2000;17:174-89.
1157. Machiulskiene V, Nyvad B, Baelum V. Prevalence and severity of dental caries in 12-year-old children in Kaunas, Lithuania 1995. *Caries Res* 1998;32(3):175-80.
1158. Burt BA. How useful are cross-sectional data from surveys of dental caries? *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25(1):36-41.
1159. Sampaio N, Mello S, Alves C. Dental caries-associated risk factors and type I diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2011;17(3):152-7.
1160. WHO. Health 21: The health for all policy framework for the WHO European Regions. *European Health for All Series: World Health Organization; 1999*.
1161. Poutanen R, Lahti S, Tolvanen M, Hausen H. Gender differences in child-related and parent-related determinants of oral health-related lifestyle among 11- to 12-year-old Finnish schoolchildren. *Acta Odontol Scand* 2007;65(4):194-200.
1162. Poutanen R, Lahti S, Hausen H. Oral health-related knowledge, attitudes, and beliefs among 11 to 12-year-old Finnish schoolchildren with different oral health behaviors. *Acta Odontol Scand* 2005;63(1):10-6.
1163. Borzabadi-Farahani A, Eslamipour F, Asgari I. Association between orthodontic treatment need and caries experience. *Acta Odontol Scand* 2010;69(1):2-11.
1164. Stahl F, Grabowski R. Malocclusion and caries prevalence: is there a connection in the primary and mixed dentitions? *Clin Oral Investig* 2004;8(2):86-90.
1165. Migale D, Barbato E, Bossu M, Ferro R, Ottolenghi L. Oral health and malocclusion in 10-to-11 years-old children in southern Italy. *Eur J Paediatr Dent* 2009;10(1):13-8.
1166. Singh A, Purohit B, Sequeira P, Acharya S, Bhat M. Malocclusion and orthodontic treatment need measured by the dental aesthetic index and its association with dental caries in Indian schoolchildren. *Community Dent Health* 2011;28(4):313-6.
1167. Lalla E, Kaplan S, Chang SM, Roth GA, Celenti R, Hinckley K, et al. Periodontal infection profiles in type I diabetes. *J Clin Periodontol* 2006;33(12):855-62.
1168. Lalla E, Cheng B, Lal S, Kaplan S, Softness B, Greenberg E, et al. Diabetes mellitus promotes periodontal destruction in children. *J Clin Periodontol* 2007;34(4):294-8.
1169. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996;67(10 Suppl):1041-9.
1170. Salkan-Seppala B, Ainamo J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1992;19(1):24-9.
1171. Seppala B, Seppala M, Ainamo J. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1993;20(3):161-5.
1172. Tervonen T, Oliver RC. Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20(6):431-5.
1173. Al-Khabbaz AK, Al-Shammari KF, Hasan A, Abdul-Rasoul M. Periodontal health of children with type I diabetes mellitus in Kuwait: a case-control study. *Med Princ Pract* 2013;22(2):144-9.
1174. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012;55(1):21-31.
1175. Grossi SG, Skrepicinski FB, DeCaro T, Zambon JJ, Cummins D, Genco RJ. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J Periodontol* 1996;67(10 Suppl):1094-102.
1176. Miller LS, Manwell MA, Newbold D, Reding ME, Rasheed A, Blodgett J, et al. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol* 1992;63(10):843-8.
1177. Pinducciu G, Micheletti L, Piras V, Songini C, Serra C, Pompei R, et al. Periodontal disease, oral microbial flora and salivary antibacterial factors in diabetes mellitus type I patients. *Eur J Epidemiol* 1996;12(6):631-6.
1178. Hayden P, Buckley LA. Diabetes mellitus and periodontal disease in an Irish population. *J Periodontol Res* 1989;24(5):298-302.
1179. Tchobroutsky G. Relation of diabetic control to development of microvascular complications. *Diabetologia* 1978;15(3):143-52.
1180. Yalda B, Offenbacher S, Collins JG. Diabetes as a modifier of periodontal disease expression. *Periodontol* 2000 1994;6:37-49.
1181. Campbell MJ. The effect of age and the duration of diabetes mellitus on the width of the basement membrane of small vessels. *Aust Dent J* 1974;19(6):414-9.
1182. Genco RJ, Slots J. Host responses in periodontal diseases. *J Dent Res* 1984;63(3):441-51.
1183. Komman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000 1997;14:33-53.
1184. Solanki G, Solanki R. Periodontal infections as a risk factor for various systemic diseases. *International Journal of Biomedical and Advance Research* 2010;01(01):01-04.
1185. Daniel R, Gokulanathan S, Shanmugasundaram N, Lakshmigandhan M, Kavin T. Diabetes and periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci* 2012;4(Suppl 2):S280-2.

1186. Klokkevold PRM, B.L. Carranza, F.A. Influence of systemic disease and disorders on the periodontium. In: Newman MGT, H.H. Carranza, F.A., editor. Carranza's clinical periodontology. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2002. p. 204-28.
1187. Siudikiene J, Maciulskiene V, Dobrovolskiene R, Nedzelskiene I. Oral hygiene in children with type I diabetes mellitus. *Stomatologija* 2005;7(1):24-7.
1188. Hinrichs JE. The role of dental calculus and other predisposing factors. In: Newman MGT, H.H. Carranza, F.A., editor. Carranza's clinical periodontology. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2002. p. 182-203.
1189. Orlando VA, Johnson LR, Wilson AR, Maahs DM, Wadwa RP, Bishop FK, et al. Oral Health Knowledge and Behaviors among Adolescents with Type I Diabetes. *Int J Dent* 2010;2010:942124.
1190. Amunulla A, Venkatesan R, Ramakrishnan H, Arun KV, Sudarshan S, Talwar A. Lymphocyte subpopulation in healthy and diseased gingival tissue. *J Indian Soc Periodontol* 2008;12(2):45-50.
1191. Seymour GJ. Importance of the host response in the periodontium. *J Clin Periodontol* 1991;18(6):421-6.
1192. Demir T, Canakci V, Erdem F, Atasever M, Kara C, Canakci CF. The effects of age and gender on gingival tissue and peripheral blood T-lymphocyte subsets: a study in mice. *Immunol Invest* 2008;37(2):171-82.
1193. Segquier S, Godeau G, Leborgne M, Pivert G, Brousse N. Immunohistologic and morphometric analysis of cytotoxic T lymphocytes in gingivitis. *J Periodontol* 1999;70(11):1383-91.
1194. Segquier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol* 2001;72(10):1398-406.
1195. Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol* 2001;125(1):134-41.
1196. Coulter WA, Murray SD, Kinirons MJ. The use of a concentrated oral rinse culture technique to sample oral candida and lactobacilli in children, and the relationship between candida and lactobacilli levels and dental caries experience: a pilot study. *Int J Paediatr Dent* 1993;3(1):17-21.
1197. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10(3):359-83.
1198. Berman J, Sudbery PE. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 2002;3(12):918-30.
1199. Maccallum DM. Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. *Int J Microbiol* 2012;2012:363764.
1200. Issa SY, Badran EF, Aqel KF, Shehabi AA. Epidemiological characteristics of *Candida* species colonizing oral and rectal sites of Jordanian infants. *BMC Pediatr* 2011;11:79.
1201. Sandin RL, Rogers AL, Fernandez MI, Beneke ES. Variations in affinity to *Candida albicans* in vitro among human buccal epithelial cells. *J Med Microbiol* 1987;24(2):151-5.
1202. Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ* 2001;65(8):785-7.
1203. Epstein JB, Truelove EL, Izutzu KT. Oral candidiasis: pathogenesis and host defense. *Rev Infect Dis* 1984;6(1):96-106.
1204. Iatta R, Napoli C, Borghi E, Montagna MT. Rare mycoses of the oral cavity: a literature epidemiologic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(5):647-55.
1205. Bremskamp RM, Caris AR, Jorge AO, Back-Brito GN, Mota AJ, Balducci I, et al. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol* 2011;56(6):549-55.
1206. Gibbons RJ, Houte JV. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 1975;29:19-44.
1207. Epstein JB, Pearsall NN, Truelove EL. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J Clin Microbiol* 1980;12(3):475-6.
1208. Bratthall DC, P. Clinical microbiology of saliva. In: Tenovuo JO, editor. Human saliva: clinical chemistry and microbiology: CRC Press, Inc.; 1989.
1209. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res* 1995;74(5):1152-61.
1210. Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A, Galle F, Signoriello G, Colella G, et al. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24(1):76-8.
1211. Kotloff RM, Ahya VN, Crawford SW. Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(1):22-48.
1212. Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(1):80-96.
1213. Pereira-Dias S, Potes ME, Marinho A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *Int J Food Microbiol* 2000;60(1):55-63.
1214. Sedgley CM, Samaranyake LP, Chan JC, Wei SH. A 4-year longitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12(3):183-8.
1215. Akdeniz BG, Koparal E, Sen BH, Ates M, Denizci AA. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. *ASDC J Dent Child* 2002;69(3):289-92, 35.
1216. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 2003;36(4):223-8.
1217. Grodzka K. Studies on the correlation between dental caries and the presence of *Candida* in the oral cavity of children. *Pol Med J* 1969;8(4):1004-23.
1218. Russell JI, MacFarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW, Burchell CK. Prediction of caries increment in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19(2):74-7.
1219. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol* 1997;42(7):513-20.
1220. Majjala M, Rautemaa R, Jarvensivu A, Richardson M, Salo T, Tjaderhane L. *Candida albicans* does not invade carious human dentine. *Oral Dis* 2007;13(3):279-84.
1221. Jacob LS, Flaitz CM, Nichols CM, Hicks MJ. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. *J Am Dent Assoc* 1998;129(2):187-94.
1222. Thein ZM, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol* 2006;51(8):672-80.
1223. Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses* 2009;52(6):467-75.
1224. Sobel JD, Myers PG, Kaye D, Levison ME. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. *J Infect Dis* 1981;143(1):76-82.
1225. Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci* 2005;85(2):809-22.
1226. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am* 2011;55(1):159-78.
1227. Lanza IR, Zhang S, Ward LE, Karakelides H, Raftery D, Nair KS. Quantitative metabolomics by H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes. *PLoS One* 2010;5(5):e10538.
1228. Felig P, Marliss E, Ohman JL, Cahill CF, Jr. Plasma amino acid levels in diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 1970;19(10):727-8.
1229. Gench JE, Tsalkian E, Lorenzi M, Karam JH, Bier DM. Plasma glucagon and alanine responses to acute insulin deficiency in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;40(3):526-9.
1230. Zuppi C, Messana I, Tapanainen P, Knip M, Vincenzoni F, Giardina B, et al. Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine from children and adolescents with type I diabetes. *Clin Chem* 2002;48(4):660-2.

1231. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 2011;17(4):448-53.
1232. Lyons TJ, Basu A. Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. *Transl Res* 2012;159(4):303-12.
1233. Sola-Penna M. Metabolic regulation by lactate. *IUBMB Life* 2008;60(9):605-8.
1234. Mochida T, Tanaka T, Shiraki Y, Tajiri H, Matsumoto S, Shimbo K, et al. Time-dependent changes in the plasma amino acid concentration in diabetes mellitus. *Mol Genet Metab* 2011;103(4):406-9.
1235. Borg Andersson A, Birkhed D, Berntorp K, Lindgarde F, Matsson L. Glucose concentration in parotid saliva after glucose/food intake in individuals with glucose intolerance and diabetes mellitus. *Eur J Oral Sci* 1998;106(5):931-7.
1236. Zloczower M, Reznick AZ, Zouby RO, Nagler RM. Relationship of flow rate, uric acid, peroxidase, and superoxide dismutase activity levels with complications in diabetic patients: can saliva be used to diagnose diabetes? *Antioxid Redox Signal* 2007;9(6):765-73.
1237. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012;489(7415):242-9.
1238. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 2009;58(7):1509-17.
1239. Ohshiro K, Rosenthal DI, Koomen JM, Streckfus CF, Chambers M, Kobayashi R, et al. Pre-analytic saliva processing affect proteomic results and biomarker screening of head and neck squamous carcinoma. *Int J Oncol* 2007;30(3):743-9.
1240. Lukacs JR, Largaespada LL. Explaining sex differences in dental caries prevalence: saliva, hormones, and "life-history" etiologies. *Am J Hum Biol* 2006;18(4):540-55.
1241. Schipper R, Loof A, de Groot J, Harthoorn L, van Heerde W, Dransfield E. Salivary protein/peptide profiling with SELDI-TOF-MS. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:498-503.
1242. Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 2000;50(3):140-61.
1243. Kelsay JL, Behall KM, Holden JM, Crutchfield HC. Pyruvate and lactate in human blood and saliva in response to different carbohydrates. *J Nutr* 1972;102(5):661-6.
1244. Papanayotou PH, Dozi-Vassiliades J, Kovatsis A. Free amino acids in human saliva. *J Dent Res* 1973;52(3):418-9.
1245. Kurita H, Kamata T, Zhao C, Narikawa JN, Koike T, Kurashina K. Usefulness of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit for *Candida* mannan antigen for detecting *Candida* in oral rinse solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107(4):531-4.
1246. Vellucci VF, Gygax SE, Hostetter MK. Involvement of *Candida albicans* pyruvate dehydrogenase complex protein X (Pdx1) in filamentation. *Fungal Genet Biol* 2007;44(10):979-90.
1247. Han TL, Cannon RD, Villas-Boas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol* 2011;48(8):747-63.
1248. Barelle CJ, Priest CL, Maccallum DM, Gow NA, Odds FC, Brown AJ. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* 2006;8(6):961-71.
1249. Lorenz MC, Bender JA, Fink GR. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* 2004;3(5):1076-87.
1250. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol* 2009;80(3):436-46.
1251. Koss MA, Castro CE, Salum KM, Lopez ME. Changes in saliva protein composition in patients with periodontal disease. *Acta Odontol Latinoam* 2009;22(2):105-12.
1252. Zhang L, Henson BS, Camargo PM, Wong DT. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol 2000* 2009;51:25-37.
1253. Goncalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics* 2010;73(7):1334-41.
1254. Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37(3):241-7.
1255. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodontol Res* 2009;44(5):636-44.
1256. Denny PC. A saliva-based prognostic test for dental caries susceptibility. *J Dent Hyg* 2009;83(4):175-6.
1257. Denny PC, Denny PA, Takashima J, Si Y, Navazesh M, Galligan JM. A novel saliva test for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc* 2006;34(4):287-90, 92-4.
1258. Silwood CJ, Lynch EJ, Seddon S, Sheerin A, Claxson AW, Grootveld MC. 1H-NMR analysis of microbial-derived organic acids in primary root carious lesions and saliva. *NMR Biomed* 1999;12(6):345-56.
1259. Featherstone JD, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res* 1981;15(5):377-85.
1260. Minah GE, Loesche WJ. Sucrose metabolism by prominent members of the flora isolated from cariogenic and non-cariogenic dental plaques. *Infect Immun* 1977;17(1):55-61.
1261. Hojo S, Komatsu M, Okuda R, Takahashi N, Yamada T. Acid profiles and pH of carious dentin in active and arrested lesions. *J Dent Res* 1994;73(12):1853-7.
1262. Syrjänen SM, Alakujala L, Alakujala P, Markkanen SO, Markkanen H. Free amino acid levels in oral fluids of normal subjects and patients with periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1990;35(3):189-93.
1263. Distler W, Kroncke A. Acid formation by mixed cultures of dental plaque bacteria *Actinomyces* and *Veillonella*. *Arch Oral Biol* 1981;26(2):123-6.
1264. Traudt M, Kleinberg I. Stoichiometry of oxygen consumption and sugar, organic acid and amino acid utilization in salivary sediment and pure cultures of oral bacteria. *Arch Oral Biol* 1996;41(10):965-78.
1265. Carlsson J, Griffith CJ. Fermentation products and bacterial yields in glucose-limited and nitrogen-limited cultures of streptococci. *Arch Oral Biol* 1974;19(12):1105-9.
1266. Calandra JC, Adams EC, Jr. Oxidation of glucose degradation products in the presence of saliva and possible relation to caries immunity. *J Dent Res* 1951;30(2):229-34.
1267. Enwonwu CO, Ilupeju F, Warren RC. Arginine metabolism in the salivary glands of protein-deficient rats and its potential association with the oral microflora. *Caries Res* 1994;28(2):99-105.
1268. Nagata Y, Higashi M, Ishii Y, Sano H, Tanigawa M, Nagata K, et al. The presence of high concentrations of free D-amino acids in human saliva. *Life Sci* 2006;78(15):1677-81.
1269. Guerrant GO, Lambert MA, Moss CW. Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1982;16(2):355-60.
1270. Lemme A, Sztajer H, Wagner-Dobler I. Characterization of mleR, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol* 2010;10:58.
1271. Sheng J, Marquis RE. Malolactic fermentation by *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;272(2):196-201.
1272. Williams RADE, J.C. Basic and applied dental biochemistry. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1979.

1273. Shelmet JJ, Reichard GA, Skutches CL, Hoeldtke RD, Owen OE, Boden G. Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat, and protein oxidation and insulin resistance. *J Clin Invest* 1988;81(4):1137-45.
1274. Psihogios NG, Gazi IF, Elisaf MS, Seferiadis KI, Bairaktari ET. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabolomics. *NMR Biomed* 2008;21(3):195-207.
1275. Stambaugh R, Davidson DT, Jr., Elkinton JR. Variation in excretion of certain amino acids with age. *Clin Chem* 1963;9:210-6.
1276. Guneral F, Bachmann C. Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population. *Clin Chem* 1994;40(6):862-6.
1277. Slupsky CM, Rankin KN, Wagner J, Fu H, Chang D, Weijie AM, et al. Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Anal Chem* 2007;79(18):6995-7004.
1278. Lima DP, Diniz DG, Moimaz SA, Sumida DH, Okamoto AC. Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis* 2010;14(3):e184-8.
1279. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med* 2010;4(1):171-89.
1280. Vidovic A, Vidovic Juras D, Vucicevic Boras V, Lukac J, Grubisic-Ilic M, Rak D, et al. Determination of leucocyte subsets in human saliva by flow cytometry. *Arch Oral Biol* 2012;57(5):577-83.
1281. Wright DE. The differential leucocyte count of human saliva. *Arch Oral Biol* 1968;13(9):1159-61.
1282. Raeste AM. The differential count of oral leukocytes. *Scand J Dent Res* 1972;80(1):63-7.
1283. Klinkhamer JM, Zimmerman S. The function and reliability of the orogranulocytic migratory rate as a measure of oral health. *J Dent Res* 1969;48(5):709-15.
1284. Gasparoto TH, Vieira NA, Porto VC, Campanelli AP, Lara VS. Ageing exacerbates damage of systemic and salivary neutrophils from patients presenting Candida-related denture stomatitis. *Immun Ageing* 2009;6:3.
1285. Bender JS, Thang H, Glogauer M. Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. *J Periodontol Res* 2006;41(3):214-20.
1286. Tenovuo JO. Nonimmunoglobulin defense factors in human saliva. In: Tenovuo JO, editor. *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*. CRC Press, Inc.; 1989.
1287. Klinkhamer JM. Quantitative evaluation of gingivitis and periodontal disease. I. The orogranulocytic migratory rate. *Periodontics* 1968;6(5):207-11.
1288. Schiott CR, Loe H. The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. *J Periodontol Res* 1970;5(1):36-41.
1289. Friedman LA, Klinkhamer JM. Experimental human gingivitis. *J Periodontol* 1971;42(11):702-5.
1290. Thomas ML. The regulation of B- and T-lymphocyte activation by the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(2):247-52.
1291. Thomas ML, Lefrancois L. Differential expression of the leucocyte-common antigen family. *Immunol Today* 1988;9(10):320-6.
1292. Spertini F, Wang AV, Chatila T, Geha RS. Engagement of the common leukocyte antigen CD45 induces homotypic adhesion of activated human T cells. *J Immunol* 1994;153(4):1593-602.
1293. Monteagudo C, Lopez-Ribot JL, Murgui A, Casanova M, Chaffin WL, Martinez JP. Immunodetection of CD45 epitopes on the surface of Candida albicans cells in culture and infected human tissues. *Am J Clin Pathol* 2000;113(1):59-63.
1294. Kirchberger S, Majdic O, Bluml S, Schrauf C, Leitner J, Gerner C, et al. The cytoplasmic tail of CD45 is released from activated phagocytes and can act as an inhibitory messenger for T cells. *Blood* 2008;112(4):1240-8.
1295. Harvath L, Balke JA, Christiansen NP, Russell AA, Skubitz KM. Selected antibodies to leukocyte common antigen (CD45) inhibit human neutrophil chemotaxis. *J Immunol* 1991;146(3):949-57.
1296. Klaus SJ, Sidorenko SP, Clark EA. CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J Immunol* 1996;156(8):2743-53.
1297. Harsunen MH, Puff R, D'Orlando O, Giannopoulou E, Lachmann L, Beyerlein A, et al. Reduced Blood Leukocyte and Neutrophil Numbers in the Pathogenesis of Type I Diabetes. *Horm Metab Res* 2013.
1298. Sima C, Rhourida K, Van Dyke TE, Gyurko R. Type I diabetes predisposes to enhanced gingival leukocyte margination and macromolecule extravasation in vivo. *J Periodontol Res* 2010;45(6):748-56.
1299. Karima M, Kantarci A, Ohira T, Hasturk H, Jones VL, Nam BH, et al. Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. *J Leukoc Biol* 2005;78(4):862-70.
1300. Tong PC, Lee KF, So WY, Ng MH, Chan WB, Lo MK, et al. White blood cell count is associated with macro- and microvascular complications in chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(1):216-22.
1301. Ford ES. Leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate, and diabetes incidence in a national sample of US adults. *Am J Epidemiol* 2002;155(1):57-64.
1302. Tran B, Oliver S, Rosa J, Galassetti P. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type I diabetes: an overview of ten years of studies. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:683680.
1303. Schuit KE. Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeasts by human monocytes and neutrophils. *Infect Immun* 1979;24(3):932-8.
1304. Mouyenet P, Picot C, Nicolas P, Genetet B, Apiou J, Genetet N, et al. Ex vivo studies of polymorphonuclear neutrophils from patients with early-onset periodontitis (III). CR3 and LFA-1 expression by peripheral blood and gingival crevicular polymorphonuclear neutrophils. *J Clin Periodontol* 1995;22(2):110-7.
1305. Alba-Loureiro TC, Hirabara SM, Mendonca JR, Curi R, Pithon-Curi TC. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. *J Endocrinol* 2006;188(2):295-303.
1306. Dos-Santos MC, Matos-Gomes N, Makimoto FH, Katsurayama M, Santana LL, Becker MA, et al. Cell phenotyping in saliva of individuals under psychological stress. *Cell Immunol* 2009;260(1):39-43.
1307. Scully C, Challacombe SJ. The migration of ¹¹¹Indium-labelled polymorphonuclear leucocytes into the oral cavity in the rhesus monkey. *J Periodontol Res* 1979;14(6):475-81.
1308. Uehara A, Sugawara S, Watanabe K, Echigo S, Sato M, Yamaguchi T, et al. Constitutive expression of a bacterial pattern recognition receptor, CD14, in human salivary glands and secretion as a soluble form in saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(2):286-92.
1309. Fernandez-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, Lopez-Bermejo A, Ricart W. CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(4):1780-4.
1310. Mikuls TR, LeVan TD, Sayles H, Yu F, Caplan L, Cannon GW, et al. Soluble CD14 and CD14 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38(12):2509-16.
1311. Ferreira MA, Mangino M, Brumme CJ, Zhao ZZ, Medland SE, Wright MJ, et al. Quantitative trait loci for CD4:CD8 lymphocyte ratio are associated with risk of type I diabetes and HIV-1 immune control. *Am J Hum Genet* 2010;86(1):88-92.
1312. Pahwa S, Read JS, Yin W, Matthews Y, Shearer W, Diaz C, et al. CD4+/CD8+ T cell ratio for diagnosis of HIV-1 infection in infants: Women and Infants Transmission Study. *Pediatrics* 2008;122(2):331-9.
1313. Otton R, Soriano FG, Verlengia R, Curi R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. *J Endocrinol* 2004;182(1):145-56.
1314. Eastman S, Markholst H, Wilson D, Lemmark A. Leukocytosis at the onset of diabetes in crosses of inbred BB rats. *Diabetes Res Clin Pract* 1991;12(2):113-23.
1315. Flood RG, Chiang VW. Rate and prediction of infection in children with diabetic ketoacidosis. *Am J Emerg Med* 2001;19(4):270-3.

1316. Maraschio MA, Kayler LK, Merion RM, Rudich SM, Punch JD, Magee JC, et al. Successful surgical salvage of partial pancreatic allograft thrombosis. *Transplant Proc* 2003;35(4):1491-3.
1317. Jackson R, Rassi N, Crump T, Haynes B, Eisenbarth GS. The BB diabetic rat. Profound T-cell lymphocytopenia. *Diabetes* 1981;30(10):887-9.
1318. Yale JF, Grose M, Marliss EB. Time course of the lymphopenia in BB rats. Relation to the onset of diabetes. *Diabetes* 1985;34(10):955-9.
1319. Elder ME, Maclaren NK. Identification of profound peripheral T lymphocyte immunodeficiencies in the spontaneously diabetic BB rat. *J Immunol* 1983;130(4):1723-31.
1320. Jung CG, Kamiyama T, Agui T. Elevated apoptosis of peripheral T lymphocytes in diabetic BB rats. *Immunology* 1999;98(4):590-4.
1321. Otton R, Mendonca JR, Curi R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. *J Endocrinol* 2002;174(1):55-61.
1322. Shidham VB, Swami VK. Evaluation of apoptotic leukocytes in peripheral blood smears. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(9):1291-4.
1323. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155(3):1151-64.
1324. Luczynski W, Stasiak-Barmuta A, Urban R, Urban M, Florys B, Hryszko M. Lower percentages of T regulatory cells in children with type I diabetes - preliminary report. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2009;15(1):34-8.
1325. Eringsmark Regnell S, Lemmark A. The environment and the origins of islet autoimmunity and Type I diabetes. *Diabet Med* 2012.
1326. Oling V, Reijonen H, Simell O, Knip M, Ilonen J. Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type I diabetes. *Cell Immunol* 2012;273(2):133-9.
1327. Bending D, Zaccone P, Cooke A. Inflammation and type one diabetes. *Int Immunol* 2012;24(6):339-46.
1328. Gupta S, Fikrig SM, Khanna S, Orti E. Deficiency of suppressor T-cells in insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis with monoclonal antibodies. *Immunol Lett* 1982;4(5):289-94.
1329. Horita M, Suzuki H, Onodera T, Ginsberg-Fellner F, Fauci AS, Notkins AL. Abnormalities of immunoregulatory T cell subsets in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 1982;129(4):1426-9.
1330. Hyoty H. Flow-cytometric analysis of lymphocyte subsets in relation to virus infections at the onset of type I (insulin-dependent) diabetes. *APMIS* 1988;96(8):741-8.
1331. Ilonen J, Surcel HM, Kaar ML. Abnormalities within CD4 and CD8 T lymphocytes subsets in type I (insulin-dependent) diabetes. *Clin Exp Immunol* 1991;85(2):278-81.
1332. Buschard K, Ropke C, Madsbad S, Mehlsen J, Sorensen TB, Rygaard J. Alterations of peripheral T-lymphocyte subpopulations in patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *J Clin Lab Immunol* 1983;10(3):127-31.
1333. Peakman M, Alviggi L, Hussain MJ, Lo SS, Hawa M, Leslie RD, et al. Increased expression of T-cell markers of immunological memory associated with protection from type I diabetes. A study of identical twins. *Diabetes* 1994;43(5):712-7.
1334. Buschard K, Ropke C, Madsbad S, Mehlsen J, Rygaard J. T lymphocyte subsets in patients with newly diagnosed type I (insulin-dependent) diabetes: a prospective study. *Diabetologia* 1983;25(3):247-51.
1335. Smerdon RA, Peakman M, Hussain MJ, Vergani D. Lymphocyte vaccination prevents spontaneous diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunology* 1993;80(3):498-501.
1336. Peakman M, Wamock T, Vats A, McNab GL, Underhill J, Donaldson PT, et al. Lymphocyte subset abnormalities, autoantibodies and their relationship with HLA DR types in children with type I (insulin-dependent) diabetes and their first degree relatives. *Diabetologia* 1994;37(2):155-65.
1337. Petersen LD, Duinkerken G, Bruining GJ, van Lier RA, de Vries RR, Roep BO. Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 1996;9(6):731-7.
1338. Gorr SU. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol* 2000 2009;51:152-80.
1339. Diamond RD. Interactions of phagocytic cells with *Candida* and other opportunistic fungi. *Arch Med Res* 1993;24(4):361-9.
1340. Greenfield RA. Host defense system interactions with *Candida*. *J Med Vet Mycol* 1992;30(2):89-104.
1341. Szczawinska-Poplonyk A. Development of mucosal immunity in children: a rationale for sublingual immunotherapy? *J Allergy (Cairo)* 2012;2012:492761.
1342. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009;206(2):299-311.
1343. Conti HR, Baker O, Freeman AF, Jang WS, Holland SM, Li RA, et al. New mechanism of oral immunity to mucosal candidiasis in hyper-IgE syndrome. *Mucosal Immunol* 2011;4(4):448-55.
1344. Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen HP. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. *Oral Dis* 2000;6(2):85-91.
1345. Al-Maskari AY, Al-Maskari MY, Al-Sudairy S. Oral Manifestations and Complications of Diabetes Mellitus: A review. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2011;11(2):179-86.
1346. Saini R, Al-Maweri SA, Saini D, Ismail NM, Ismail AR. Oral mucosal lesions in non oral habit diabetic patients and association of diabetes mellitus with oral precancerous lesions. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;89(3):320-6.
1347. Hamison GA, Schultz TA, Schaberg SJ. Deep neck infection complicated by diabetes mellitus. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;55(2):133-7.
1348. Van der Westhuijzen AJ, Grotepass FW, Wyrna G, Padayachee A. A rapidly fatal palatal ulcer: rhinocerebral mucormycosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;68(1):32-6.
1349. Scully C, Shotts R. ABC of oral health. Mouth ulcers and other causes of orofacial soreness and pain. *BMJ* 2000;321(7254):162-5.
1350. Clark HC, Curzon ME. A prospective comparison between findings from a clinical examination and results of bitewing and panoramic radiographs for dental caries diagnosis in children. *Eur J Paediatr Dent* 2004;5(4):203-9.
1351. Hopcraft MS, Morgan MV. Comparison of radiographic and clinical diagnosis of approximal and occlusal dental caries in a young adult population. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33(3):212-8.
1352. Llena-Puy C, Forner L. A clinical and radiographic comparison of caries diagnosed in approximal surfaces of posterior teeth in a low-risk population of 14-year-old children. *Oral Health Prev Dent* 2005;3(1):47-52.

Índice

Índice geral

Agradecimentos	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
Sumário	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
Trabalhos já apresentados no decorrer desta investigação ..	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
Capítulo I. Enquadramento teórico	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1. Escolha do tema	Error! Bookmark not defined.
2. Diabetes <i>mellitus</i> - considerações gerais.....	Error! Bookmark not defined.
3. Princípios básicos da imunologia oral	Error! Bookmark not defined.
3.1 Caracterização geral dos tipos de imunidade.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Componentes gerais das imunidades inata e adaptativa com influência nas diferentes patologias orais.....	Error! Bookmark not defined.
3.3 Aspectos imunológicos relacionados com as patologias periodontais	Error! Bookmark not defined.
3.4 Aspectos imunológicos relacionados com a cárie dentária.....	Error! Bookmark not defined.
3.5 Aspectos imunológicos relacionados com infeções por leveduras do género <i>Candida</i>	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
4. Diabetes <i>mellitus</i> e patologia oral	Error! Bookmark not defined.
4.1 Diabetes <i>mellitus</i> e cárie dentária	Error! Bookmark not defined.
4.2 Diabetes <i>mellitus</i> e patologia periodontal.....	Error! Bookmark not defined.
4.3 Diabetes <i>mellitus</i> e risco de infeções.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.1 Colonização por leveduras e <i>diabetes mellitus</i>	Error! Bookmark not defined.
4.4 Alterações salivares na diabetes mellitus.....	Error! Bookmark not defined.
4.5 Outras alterações orais na diabetes mellitus	Error! Bookmark not defined.
4.5.1 Alteração dos padrões de erupção dentária.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.2 Alterações nas glândulas salivares	Error! Bookmark not defined.
4.5.3 Halitose	Error! Bookmark not defined.
4.5.4 Saburra e outras manifestações linguais.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.5 Disgeusia.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.6 Síndrome de ardor bucal	Error! Bookmark not defined.
4.5.7 Líquen plano e reações liquenóides.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.8 Ulcerações e fibromas traumáticos.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.9 Alterações pulpares.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.10 Outras alterações	Error! Bookmark not defined.
5. A abordagem da criança diabética na consulta de Medicina Dentária ..	Error! Bookmark not defined.
Capítulo II. Estudo clínico.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1. Introdução e Objetivos.....	Error! Bookmark not defined.
2. Materiais e métodos.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Generalidades	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Seleção da amostra	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 Determinação das variáveis.....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Exame clínico oral.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.1 Examinador.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Recolha de dados, registo e índices adotados	Error! Bookmark not defined.
2.3.1 Recolha de dados.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.2 Registo de dados e critérios adotados.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Caracterização salivar	Error! Bookmark not defined.
2.4.1 Colheita salivar	Error! Bookmark not defined.
2.4.2 Determinação da capacidade tampão salivar.....	Error! Bookmark not defined.
2.5 Caracterização microbiológica	Error! Bookmark not defined.
2.5.1 Colheita de amostras da mucosa e caracterização das leveduras	Error! Bookmark not defined.
defined.	
2.5.2 Determinação da composição bacteriana salivar.....	Error! Bookmark not defined.
2.6 Caracterização imunológica salivar	Error! Bookmark not defined.
2.7 Caracterização metabólica salivar	Error! Bookmark not defined.
2.8 Outros índices adotados	Error! Bookmark not defined.
2.9 Análise estatística	Error! Bookmark not defined.
2.10 Fluxograma cronológico.....	Error! Bookmark not defined.
2.11 Organograma geral dos materiais e métodos.....	Error! Bookmark not defined.
3. Resultados	Error! Bookmark not defined.
3.1 Análise descritiva.....	Error! Bookmark not defined.

3.1.1	Caracterização sociodemográfica e comportamental da amostra.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.2	Caracterização da amostra por prevalência de patologias orais.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.3	Caracterização microbiológica da amostra.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.4	Identificação e quantificação de metabolitos salivares.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.5	Caracterização da componente inflamatória salivar.....	Error! Bookmark not defined.
3.2	Análise inferencial.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1	Questão 1: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros de saúde oral?.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.2	Questão 2: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros microbiológicos orais?.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.3	Questão 3: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações do perfil metabólico salivar?.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.4	Questão 4: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos parâmetros imunoinflamatórios salivares?.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.5	Questão 5: A DM tipo I está associada, nas crianças, a alterações dos potenciais fatores de risco ambientais/comportamentais ou fisiológicos para o desenvolvimento de patologia oral?... Bookmark not defined.	Error!
4.	Discussão.....	Error! Bookmark not defined.
4.1	Análise global dos resultados.....	Error! Bookmark not defined.
4.2	Avaliação crítica da metodologia de estudo.....	Error! Bookmark not defined.
5.	Conclusões.....	Error! Bookmark not defined.
Capítulo III. Perspectivas futuras.....		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
Capítulo IV. Resumo.....		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
Capítulo V. <i>Abstract</i>		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
Capítulo VI. Bibliografia.....		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
Índice geral.....		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
	Índice de tabelas.....	Error! Bookmark not defined.
	Índice de gráficos.....	Error! Bookmark not defined.
	Índice de figuras.....	Error! Bookmark not defined.
	Índice de anexos.....	Error! Bookmark not defined.
	Listagem de siglas e abreviaturas utilizadas.....	Error! Bookmark not defined.
Anexos.....		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1.	Pedidos e autorizações para realização do estudo.....	Error! Bookmark not defined.
a)	Comissão de Ética da FMUC.....	Error! Bookmark not defined.
b)	Comissão de Ética do CHC.....	Error! Bookmark not defined.
c)	Comissão de Ética dos HUC.....	Error! Bookmark not defined.
2.	Pedido de alteração de título da tese de Doutoramento.....	Error! Bookmark not defined.
3.	Consentimento informado.....	Error! Bookmark not defined.
4.	Registo clínico.....	Error! Bookmark not defined.
5.	Classificação das variáveis em estudo.....	Error! Bookmark not defined.
6.	Identificação das espécies de leveduras.....	Error! Bookmark not defined.

Listagem de tabelas

Tabela I. Classificação das superfícies, de acordo com o ICDAS-II, relativamente à presença de restaurações e selantes de fissuras, eventuais lesões de cárie e perdas dentárias.

Tabela II. Caracterização sociodemográfica da amostra (n= 205).

Tabela III . Caracterização comportamental geral da amostra.

Tabela IV. Caracterização geral da amostra relativamente à ocorrência de patologia oral.

Tabela V. Caraterização das crianças integrantes da amostra total e por idades padrão (6,12 e 15 anos) com valores=0 para os índices CPO/cpo.

Tabela VI. Caracterização geral da distribuição de cárie dentária através dos índices CPO, cpo e SiC (se aplicável), por idades padrão (6,12 e 15 anos) e de acordo com a condição clínica.

Tabela VII. Presença de leveduras na saliva e mucosa.

Tabela VIII . Carga de leveduras na saliva e mucosa.

Tabela IX . Número de espécies de leveduras na saliva e mucosa.

Tabela X . Distribuição das diferentes espécies de leveduras na saliva e mucosa.

Tabela XI. Distribuição das espécies cariogénicas *S. mutans* e *Lactobacillus* na saliva.

Tabela XII Concentração na saliva (μM) dos diferentes metabolitos.

Tabela XIII. Distribuição salivar das populações e subpopulações leucocitárias.

Tabela XIV. Relação entre a condição periodontal e a presença de DM.

Tabela XV. Relação entre a condição periodontal de não diabéticos e diabéticos controlados.

Tabela XVI . Relação entre a condição periodontal de não diabéticos e diabéticos não controlados.

Tabela XVII . Relação entre a condição periodontal e os escalões etários.

Tabela XVIII . Relação entre a condição periodontal e a frequência de escovagem dentária.

Tabela XIX . Relação entre a condição periodontal e a presença de má oclusão.

Tabela XX . Relação entre o índice CPO e a idade.

Tabela XXI. Relação entre o índice CPO e a frequência de escovagem dentária.

Tabela XXII. Relação entre o índice CPO e a má oclusão.

Tabela XXIII. Relação entre o índice CPO e a carga bacteriana salivar.

Tabela XXIV. Relação entre o índice cpo e a presença de DM.

Tabela XXV. Relação entre o índice cpo de não diabéticos e diabéticos controlados.

Tabela XXVI. Relação entre o índice cpo de diabéticos não controlados e de não diabéticos.

Tabela XXVII. Relação entre o índice cpo e os escalões etários.

Tabela XXVIII. Relação entre o índice cpo e o género.

Tabela XXIX. Relação entre o índice cpo e o número de refeições diárias.

Tabela XXX. Relação entre o índice cpo e a carga bacteriana salivar.

Tabela XXXI. Relação entre a prevalência de outras patologias orais e a presença de DM.

Tabela XXXII. Relação entre a presença de outras patologias orais e a idade da 1ª consulta de Medicina Dentária.

Tabela XXXIII. Relação entre a carga bacteriana salivar e ser não diabético/diabético controlado.

Tabela XXXIV. Relação entre a carga bacteriana salivar e o género.

Tabela XXXV. Relação entre carga bacteriana salivar e frequência de escovagem dentária.

Tabela XXXVI. Relação entre a carga bacteriana e a capacidade tampão da saliva.

Tabela XXXVII. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com a presença de DM.

Tabela XXXVIII. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com a presença de DM.

Tabela XXXIX. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com os subgrupos clínicos.

Tabela XL. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com os subgrupos clínicos.

Tabela XLI. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com os anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

Tabela XLII. Análise da biodiversidade salivar de leveduras relativamente aos anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

Tabela XLIII. Distribuição do tipo de leveduras na saliva por escalões etários.

Tabela XLIV. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com os escalões etários.

Tabela XLV. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com o género.

Tabela XLVI. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com o género.

Tabela XLVII. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com a área de residência.

Tabela XLVIII. Análise da biodiversidade salivar de leveduras de acordo com a área de residência.

Tabela XLIX. Distribuição do tipo de leveduras na saliva de acordo com a frequência de escovagem dentária.

Tabela L. Análise da biodiversidade salivar de leveduras em relação à frequência de escovagem dentária.

Tabela LI. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a presença de DM.

Tabela LII. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e ser diabético não controlado ou não diabético.

Tabela LIII. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a respetiva carga.

Tabela LIV. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com a presença de DM.

Tabela LV. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa de acordo com a presença de DM.

Tabela LVI. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com os subgrupos clínicos.

Tabela LVII. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa de acordo com os subgrupos clínicos.

Tabela LVIII. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com os anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

Tabela LIX. Análise da biodiversidade da mucosa em relação aos anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

Tabela LX. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa por escalões etários.

Tabela LXI. Análise da biodiversidade da mucosa de acordo com a idade.

Tabela LXII. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com o género.

Tabela LXIII. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa de acordo com o género.

Tabela LXIV. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com a área de residência.

Tabela LXV. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa de acordo com a área de residência.

Tabela LXVI. Distribuição do tipo de leveduras na mucosa de acordo com a frequência de escovagem dentária.

Tabela LXVII. Análise da biodiversidade de leveduras da mucosa em relação à frequência de escovagem dentária.

Tabela LXVIII. Relação entre o tipo de espécies de leveduras na mucosa (*C. albicans* vs outras espécies) e o número de refeições diárias.

Tabela LXIX. Relação entre o nível de formação dos progenitores e o controlo metabólico da DM.

Tabela LXX. Relação entre a frequência de escovagem dentária e o controlo metabólico da DM.

Tabela LXXI. Relação entre a frequência de escovagem dentária e ser não diabético/diabético não controlado.

Tabela LXXII. Relação entre n° de refeições diárias e a presença de DM.

Tabela LXXIII. Relação entre n° de refeições diárias e ser diabético controlado/não diabético.

Tabela LXXIV. Relação entre número de refeições diárias e ser diabético não controlado/ser não diabético.

Tabela LXXV. Relação entre a frequência do consumo de guloseimas e a presença de DM.

Tabela LXXVI. Relação entre a frequência do consumo de guloseimas e ser diabético controlado/ não diabético.

Tabela LXXVII. Relação entre a frequência do consumo de guloseimas e ser diabético não controlado/não diabético.

Tabela LXXVIII. Relação entre a idade e a presença de DM.

Tabela LXXIX. Relação entre a idade e o controlo metabólico da DM.

Tabela LXXX. Relação entre a idade e ser diabético não controlado/não diabético.

Tabela LXXXI. Relação entre o género e a presença de DM.

Tabela LXXXII. Relação entre o género e ser diabético não controlado/não diabético.

Tabela LXXXIII. Relação entre a má oclusão e a presença de DM.

Tabela LXXXIV. Relação entre a capacidade tampão salivar e ser diabético controlado/não diabético.

Listagem de gráficos

Gráfico 1. Caracterização das crianças integrantes da amostra total e por idades padrão (6,12 e 15 anos) com valores=0 para os índices CPO/cpo.

Gráfico 2. Caracterização geral da distribuição de cárie dentária através dos índices CPO e SiC aos 12 anos de acordo com a condição clínica.

Gráficos 3-10. Concentração na saliva (μM) dos diferentes metabolitos.

Gráficos 11-17. Distribuição salivar das populações e subpopulações leucocitárias.

Gráfico 18. Gráfico de barras de erro (média \pm 2erro padrão) representando a relação entre a condição periodontal e a subpopulação celular salivar de CD3+.

Gráfico 19. Gráfico de barras de erro (média \pm 2erro padrão) apresentando a relação entre o índice CPO e o controlo metabólico da DM.

Gráfico 20. Relação entre a carga bacteriana e a concentração salivar de lactato.

Gráfico 21. Relação entre a carga bacteriana e a carga de leveduras.

Gráfico 22-27. Gráficos 22-27. Relação entre a presença de leveduras na saliva e a concentração salivar de propionato, alanina, etanol, butirato, acetato e formato.

Gráfico 28. Relação entre a presença de leveduras na mucosa e a subpopulação salivar de CD8+.

Gráfico 29-32. Relação entre a presença de leveduras na mucosa e a concentração salivar de propionato, etanol, acetato e formato.

Gráfico 33. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a subpopulação salivar de CD45+.

Gráfico 34. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a subpopulação salivar de CD14+.

Gráfico 35. Relação entre o tipo de leveduras na saliva (*C. albicans* vs outras espécies) e a subpopulação salivar de CD8+.

Gráfico 36. Relação entre o tipo de espécies de leveduras na mucosa (*C. albicans* vs outras espécies) e a concentração salivar de malato.

Gráfico 37. Relação entre a concentração salivar de alanina e a presença de DM.

Gráfico 38. Relação entre a concentração salivar de alanina e os escalões etários.

Gráfico 39. Relação entre a concentração salivar de etanol e a presença de DM.

Gráfico 40. Relação entre a concentração salivar de etanol e ser não diabético/diabético controlado.

Gráfico 41. Relação entre a concentração salivar de malato e a presença de DM.

Gráfico 42. Relação entre a concentração salivar de malato e ser não diabético/diabético controlado.

Gráfico 43. Relação entre a concentração salivar de butirato e a presença de DM.

Gráfico 44. Relação entre a concentração salivar de butirato e ser não diabético/diabético controlado.

Gráfico 45. Relação entre a concentração salivar de butirato e o género.

Gráfico 46. Relação entre a presença de DM e a subpopulação salivar de CD45+.

Gráfico 47. Relação entre a subpopulação salivar de CD45+ e ser diabético controlado/ser não diabético.

Gráfico 48. Relação entre a subpopulação salivar de granulócitos e a presença de DM.

Gráfico 49. Relação entre a subpopulação salivar de granulócitos e ser diabético controlado/não diabético.

Gráfico 50. Relação entre a subpopulação salivar de CD14+ e os escalões etários.

Gráfico 51. Relação entre a subpopulação salivar de CD3+ e a presença de DM.

Gráfico 52. Relação entre a subpopulação salivar de CD3+ e ser diabético controlado/ser não diabético.

Gráfico 53. Relação entre a subpopulação salivar de CD3+ e os anos decorridos desde o diagnóstico da DM.

Gráfico 54. Relação entre a subpopulação salivar de CD4+ e a presença de DM.

Gráfico 55. Relação entre a subpopulação salivar de CD4+ e ser diabético controlado/ser não diabético.

Listagem de figuras

Figura 1. Representação esquemática abreviada de alguns dos diferentes componentes celulares do sistema imunitário.

Figuras 2-5. Ilustração da técnica de colheita das amostras salivares.

Figura 6. Ilustração disponibilizada pelo fabricante com as instruções para determinação da capacidade tampão salivar com recurso a tiras de teste (CRT® Buffer, Ivoclar Vivadent®, Stockholm, Liechtenstein).

Figuras 7-13. Ilustração de alguns dos passos referentes à colheita dos dois tipos de amostras biológicas (saliva e mucosa) e posterior caracterização do padrão de colonização por leveduras (carga e tipo de espécies).

Figura 14. Ilustração disponibilizada pelo fabricante de alguns dos passos referentes à colheita de saliva estimulada e posterior caracterização do padrão de colonização bacteriológica (*S. mutans* e *Lactobacillus*) utilizando o teste CRT® bactéria (Ivoclar Vivadent®, Schaan, Liechtenstein).

Figuras 15-20. Ilustração de alguns dos passos das técnicas de colheita, preparação e análise por citometria de fluxo das amostras salivares.

Figuras 21-29. Ilustração de alguns dos passos das técnicas de preparação e análise das amostras salivares por ¹H-RMN.

Figuras 30-33. Ilustração de algumas das condições clínicas identificadas durante o exame clínico das crianças em estudo, respectivamente: patologia periodontal; cárie dentária; glossite rombóide mediana e pigmentação negra extrínseca.

Figuras 34a e 34b. Exemplo de uma análise PCA com as componentes principais F1, F2 e F3: F1 (48% variância); F2 (19% variância); F3 (12% variância).

Listagem de anexos

Anexos 1a, b e c. Pedidos e autorizações para realização do estudo: Comissões de Ética do Centro Hospitalar de Coimbra, Hospitais da Universidade de Coimbra e Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Anexo 2. Pedido de alteração de título da tese de Doutoramento.

Anexo 3. Consentimento informado.

Anexo 4. Registo clínico.

Anexo 5. Classificação das variáveis em estudo.

Anexo 6. Identificação das espécies de leveduras.

Listagem de siglas e abreviaturas utilizadas

AGEs - *Advanced Glycation End-products*

AGP - α 1 *Acid Glycoprotein*

APCs – *Antigen Presenting Cells* ou células apresentadoras de antígenos

BMS - *Burning Mouth Syndrome*

CD – *Cluster of Differentiation*

CFU ou UFC – *Colony Forming-Unity* ou Unidades Formadoras de Colônias

CLR - *C-type lectin receptors*

cpo/CPO – Índice de dentes Cariados, Perdidos e Obturados dentição temporária/permanente

CSV - Compostos Sulfurados Voláteis

DM - *Diabetes mellitus*

DM tipo 1/ DM1/ IDDM - *Diabetes mellitus* tipo 1, insulino-dependente

DM tipo 2/ DM2/ NIDDM - *Diabetes mellitus* tipo 2, não insulino-dependente

DP – Doença Periodontal

EGF - *Epidermal Growth Factor*

EGOHID - *European Global Oral Health Indicators Development*

EPS - *Extracellular Polymeric Substances*

EURODIAB - *The Epidemiology and prevention of Diabetes European Project*

FID - *Free Induction Decay*

GADA - *Glutamic-Acid Decarboxylase Auto-antibodies*

GC-MS - *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de próton

HbA_{1c} ou A_{1c} - Hemoglobina glicosilada (ou glicada)

HSP - *Heat Shock Proteins*

IA-2A - *Tyrosine Phosphatase 2*

ICDAS - *International Caries Detection and Assessment System*

IFN γ - Interferão gamma

Igs - Imunoglobulinas

IL – Interleucina

IMC - Índice de Massa Corporal

IS - Índice de Simpson

LB – Linfócitos B

LC-MS - *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LCA - *Leucocyte Common Antigen*

LDL - *Low-Density Lipoproteins*

LT – *Linfócitos T*

MALT/GALT/BALT/NALT - *Mucosa/Gut/Bronchus/Nasopharinx-Associated Lymphoid Tissue*

MAP Kinase/PKC - *Mitogen-Activated Protein Kinase/Protein kinase C*

mCD14 - *membrane-bound CD14*

min – *minuto*

MMP – *Matrix Metalloproteinases*

MS - *Mass Spectrometry*

NK - *Natural Killer cells*

NOD **mouse model** - *Non-Obese Diabetic mouse model*

PBS - *Phosphate Buffer Saline*

PCA – *Principal Components Analysis*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PG - *Prostaglandina*

PLS-DA - *Partial Least Square Discriminant Analysis*

PMN - *Polimorfonucleares*

PRRs - *Pattern Recognition Receptors*

RFLP - *Restricion Fragment Lenght Polymorphism*

ROS - *Reactive Oxygen Species*

sCD14 - *soluble CD14*

SiC - *Significant Caries Index*

SIMCA - *Soft Independent Modeling of Class Analogy*

Th - *T helper*

TLR - *Toll like receptors*



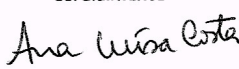
TNF - *Tumoral Necrosis Factor*

WHO/OMS - *World Health Organization / Organização Mundial da Saúde*


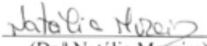
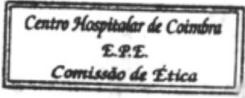
Anexos

I. Pedidos e autorizações para realização do estudo


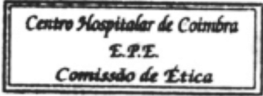
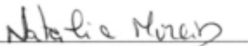
a) Comissão de Ética da FMUC

 FACULDADE DE MEDICINA DE COIMBRA DEPARTAMENTO DE MEDICINA DENTÁRIA ESTOMATOLOGIA E CIRURGIA MAXILO-FACIAL Telef. 239 484 183 / Fax 239 402 910 E-mail: dmduc@iol.pt 3000-075 Coimbra	COMISSÃO DE ÉTICA FACULDADE DE MEDICINA UNIVERSIDADE DE COIMBRA COIMBRA <i>Suposto a decisão análoga das Direccõs Hospitalares competentes: Nada a opor. 12/1/08</i> 
Coimbra, 26 de Abril de 2008	
Exmo. Sr. Presidente da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra	
ASSUNTO: Realização do trabalho de investigação no âmbito de Doutoramento em Medicina Dentária, Ramo Odontopediatria-Ortodoncia, intitulado: Relevância da resposta imunoinflamatória na saúde oral de crianças diabéticas: impacto clínico e estratégias preventivas.	
<p>Eu, Ana Luísa Moreira Costa, Médica Dentista, Licenciada em Medicina Dentária pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, inscrita na Ordem dos Médicos Dentistas com a cédula profissional nº 3163, Assistente e aluna de Doutoramento da mesma Faculdade, solicito a V. Exas. a apreciação da possibilidade de realização de um trabalho de investigação a decorrer em paralelo no Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Pediátrico de Coimbra, dando sequência ao estudo que, no âmbito do meu Mestrado em Saúde Pública, pude desenvolver na consulta de Alergologia em 2004-2005.</p> <p>Segue em anexo a descrição do actual projecto para V/ apreciação, bem como o consentimento informado a aplicar no decorrer da investigação, documentos também enviados para apreciação pela Comissão de Ética do CHC – Hospital Pediátrico de Coimbra (da qual se anexa resposta) e HUC.</p> <p>Tive já oportunidade de contactar com a Dra. Alice Mirante, responsável pela consulta onde irá supostamente decorrer o estudo; será ainda dado conhecimento, a título informativo, ao Director do Serviço de Estomatologia do Hospital Pediátrico e dos HUC.</p> <p>Certa de que será dada atenção a este assunto com a maior brevidade possível, agradeço envio de resposta para:</p> <p>Ana Luísa Moreira Costa Urb. Casal da Eira Lote 8, 115 2ºB 3030-482 Coimbra e-mail: aluisacosta@sapo.pt tel: 965596304</p> <p style="text-align: center;">Cordialmente  (Dra. Ana Luísa Costa)</p>	

b) Comissão de Ética do CHC



 SERVIÇOS CENTRAIS CENTRO HOSPITALAR COIMBRA			
À: Faculdade de Medicina de Coimbra Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial (A/C Dr.ª Ana Luísa Costa) 3000-075 Coimbra			
V. Ref.	Sua comunicação de	Data	Nossa Referência
		03-04-2008	10/08
 Assunto: ESTUDO – “RELEVÂNCIA DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA NA SAÚDE ORAL DE CRIANÇAS DIABÉTICAS: IMPACTO CLÍNICO E ESTRATÉGIAS PREVENTIVAS”			
 Exm.º Dr.ª Ana Luísa Costa:			
<p>Considerando que o estudo tem como publico alvo crianças com idade compreendida entre os 5 e os 15 anos, recomenda esta Comissão que seja solicitada a assinatura de consentimento informado não apenas aos pais, mas também às crianças com idade igual ou superior a 10 anos, minuta do qual deverá ser remetida a esta Comissão para análise.</p> <p>Em segundo lugar, tendo em conta a natureza do estudo (rastreo), terá a requerente que acrescentar aos "benefícios para o paciente" que, uma vez detectada doença, providenciará pelo encaminhamento da criança para um serviço específico de tratamento, seja no próprio hospital, mediante autorização do director do serviço por entender que existe capacidade de absorção, seja para o sector da requerente.</p>			
 Com os melhores cumprimentos,			
<p>A Presidente da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E.</p> <p> (Dr.ª Natália Moreira)</p> 			
<small>SERVIÇOS CENTRAIS DO CENTRO HOSPITALAR DE COIMBRA Quilómetros 1000 Estrada Nacional 102 3000-075 COIMBRA Tel: 351 214 300 000 Fax: 351 214 300 000</small> <small>HOSPITAL PROVEDOR DO CENTRO HOSPITALAR DE COIMBRA Avenida Brasileira, 6000 3000-075 COIMBRA Tel: 351 214 300 000</small> <small>SERVIÇOS CENTRAIS DO CENTRO HOSPITALAR DE COIMBRA Quilómetros 1000 Estrada Nacional 102 3000-075 COIMBRA Tel: 351 214 300 000 Fax: 351 214 300 000</small> <small>www.chc.com.coimbra.pt</small>			

b) Comissão de Ética do CHC (cont.)

 SERVIÇOS CENTRAIS CENTRO HOSPITALAR COIMBRA			
À: Faculdade de Medicina de Coimbra Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial (A/C Dr.ª Ana Luísa Costa) 3000-075 Coimbra			
V. Ref.	Sua comunicação de	Data	Nossa Referência
		05-05-2008	18/08
 Assunto: ESTUDO – “RELEVÂNCIA DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA NA SAÚDE ORAL DE CRIANÇAS DIABÉTICAS: IMPACTO CLÍNICO E ESTRATÉGIAS PREVENTIVAS”			
 Exm.º Dr.ª Ana Luísa Costa:			
 Acusamos a recepção do vosso ofício de 11/04/2008, referente ao estudo supra referido e que junto anexamos.			
 Prestados os esclarecimentos solicitados, esta Comissão de Ética nada tem a opor à realização do estudo			
 Com os melhores cumprimentos,			
A Presidente da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E.			
 (Dr.ª Natália Moreira)			
<small>SERVIÇOS CENTRAIS DO CENTRO HOSPITALAR DE COIMBRA Quinta das Várzea S. Martinho do Campo 3000-075 COIMBRA Tel. 351 200 400 Fax. 351 200 400</small>			
<small>HOSPITAL GERAL, S.A. C. HOSPITAL GERAL DO BRASIL Quinta das Várzea S. Martinho do Campo 3000-075 COIMBRA Tel. 351 200 400</small>			
<small>HOSPITAL PLÁSTICO DE COIMBRA Avenida Pinheiro Branco 3000-075 COIMBRA Tel. 351 200 400</small>			
<small>UNIDADE DE SAÚDE DENTÁRIA 3000-075 COIMBRA Tel. 351 200 400</small>			
<small>UNIDADE DE SAÚDE DENTÁRIA 3000-075 COIMBRA Tel. 351 200 400</small>			

c) Comissão de Ética dos HUC

12/02/2009 12:42 FAX 239405646	DIR.MEDICA	001
--------------------------------	------------	-----



HOSPITAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE

Presidente: Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros; Vice-Presidente:
Dr. David Amador Rocha; Vogais: Dra. Maria Odete Isabel; Prof. Doutor
Carlos Alberto Fontes Ribeiro; Enfermeiro: Adélio Tinoco Mendes;
Jurista: Dra. Alexandra Vilela;
Padre: José António Afonso Pais

Visto
14/05/2008

Exma. Senhora:
Dra. Ana Luísa Moreira Costa
Urb. Casal da Eira, lote B, 115 2º B
3030 - 482 COIMBRA

N/Refº	Ofício Nº	Data
CES	173	08.05.2008

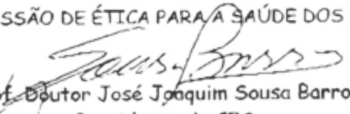
ASSUNTO: Realização de trabalho de investigação no âmbito de Doutoramento em Medicina Dentária, Ramo Odontopediatria-Ortodoncia, intitulado: "Relevância da resposta imunoinflamatória na saúde oral de crianças diabéticas: impacto clínico e estratégias preventivas."

Cumpre-me informar Vossa Ex.ª que a Comissão de Ética para a Saúde dos Hospitais da Universidade de Coimbra, reunida em 6 de Maio de 2008, com a presença da maioria dos seus membros, após análise pormenorizada do projecto mencionado em epígrafe, emitiu o seguinte parecer:

- Dado que o estudo irá decorrer no Hospital Pediátrico de Coimbra e no Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, a Comissão de Ética dos H.U.C. subscreve o parecer da CES do Centro Hospitalar de Coimbra, já existente nesta data.

Deliberação aprovada por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE DOS H.U.C.

Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros
Presidente da CES

2 . Pedido de alteração de título da tese de Doutoramento

Coimbra, 10 de Setembro de 2012

Exmo. Senhor Presidente do Conselho Científico da
Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra,
Senhor Professor Doutor Joaquim Murta

Eu, Ana Luísa Moreira Costa, Médica Dentista, Licenciada em Medicina Dentária e Mestre em Saúde Pública pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Assistente e Aluna de Doutoramento da mesma venho, por este meio, submeter à apreciação do Conselho Científico ao qual V. Exa. superiormente preside, um pedido de alteração do título da tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária, especialidade de Odontopediatria/Ortodontia: "Relevância da resposta imunoinflamatória na saúde oral de crianças diabéticas: impacto clínico e estratégias preventivas" para "Caracterização multiparamétrica da saúde oral de uma amostra de crianças portuguesas diabéticas tipo I: potenciais determinantes de intervenção preventiva e terapêutica".

Todos os pressupostos do protocolo inicial foram mantidos, ainda que com reformulação metodológica decorrente de uma abordagem mais extensa e pluridisciplinar da temática em investigação possibilitando, desta forma, uma avaliação mais complexa da cavidade oral destas crianças, não restrita apenas ao foro imunológico conforme previsto inicialmente.

Junto envio os termos de aceitação dos orientadores.

Encontro-me ao inteiro dispor para qualquer esclarecimento adicional que entenda necessário.

Pede deferimento,



Ana Luísa Moreira Costa

Alteração do título da tese de doutoramento- aprovado

11/5/12 11:05 PM

Data: Seg, 5 Nov 2012 [15:48:08]
De: Conselho Científico <ccientifico@fmed.uc.pt>
Para: aluisacosta@sapo.pt
Cc: ccientifico@fmed.uc.pt
Assunto: Alteração do título da tese de doutoramento- aprovado
Ex. ma Senhora
Dr.ª Ana Luísa Costa

Boa tarde,

Serve o presente para comunicar que a alteração ao título da tese de Doutoramento solicitada por V. Ex.ª ao Conselho Científico da FMUC, foi aprovada em reunião de 8 de outubro.

Cordiais cumprimentos,

Secretariado do Conselho Científico
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Pólo das Ciências da Saúde • Unidade Central
Azinhaga de Santa Comba, Celas
3000-354 COIMBRA • PORTUGAL
Tel.: +351 239 857 708/5 (Ext. 542708/5) | Fax: +351 239 857 745
E-mail: ccientifico@fmed.uc.pt

3. Consentimento informado

TÍTULO do ESTUDO

Caracterização multiparamétrica da saúde oral de uma amostra de crianças portuguesas diabéticas tipo I: potenciais determinantes de intervenção preventiva e terapêutica

LOCAIS ONDE DECORRERÁ

- Hospital Pediátrico de Coimbra, CHUC
- Área de Medicina Dentária, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

INVESTIGADORES

Dra. Ana Luísa Costa; Prof. Doutor João Maló de Abreu; Prof. Doutor Manuel Santos Rosa; Prof. Doutor João Carlos Ramos

OBJECTIVOS

Este trabalho terá como objectivos:

- a avaliação comparativa da prevalência de patologia oral num grupo de crianças com diagnóstico de diabetes *mellitus* (caso) e num grupo de crianças saudáveis;
- apreciar uma possível influência imunoinflamatória na diabetes em relação com lesões orais;
- procurar esclarecer uma eventual interferência do descontrolo metabólico no agravamento da patologia oral;
- reconhecer as respectivas necessidades de tratamento;
- caracterizar comportamentos em relação à saúde oral e possíveis condicionantes em termos de qualidade de vida;
- delinear estratégias profilácticas e definir a abordagem mais adequada da criança diabética na consulta de Medicina Dentária, não apenas em situação de emergência, mas também em relação a todos os cuidados a serem tomados antes, durante e após o tratamento.

CRITÉRIOS de INCLUSÃO

- Grupo I: diabéticos tipo I, de idades compreendidas entre os 5 e os 15 anos, seguidas na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Pediátrico de Coimbra;
- Grupo II: crianças saudáveis, de idades compreendidas entre os 5 e os 15 anos, seguidas na Consulta de Odontopediatria do Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

BREVE DESCRIÇÃO

Para cada criança será elaborada uma história clínica, seguida de um exame oral, com observação e registo dos parâmetros em estudo, nomeadamente lesões de cárie em dentição temporária e definitiva, patologia dos tecidos moles, alterações esqueléticas e ou de posição dentária e cuidados de higiene. Será ainda efectuada uma recolha de saliva de forma totalmente indolor e não invasiva, com a colaboração voluntária da criança, por forma a poderem ser diagnosticadas, após aplicação de diferentes testes e análises laboratoriais, eventuais alterações de fluxo e composição salivar.

3. Consentimento informado (cont.)

RISCOS para o PACIENTE

Não existem quaisquer riscos para o paciente na participação do estudo.

BENEFÍCIOS para o PACIENTE

- Aquisição de conhecimentos e kit de higiene oral que lhe permitam obter uma melhor saúde oral;
- Diagnóstico oral e sinalização de eventuais necessidades de tratamento com encaminhamento para consultas de Estomatologia e Medicina Dentária, de acordo com a disponibilidade das mesmas e em casos de gravidade extrema.

DIREITO a RECUSA

Os pacientes podem recusar a participação no estudo em qualquer altura, sem prejuízo próprio.

DIREITO a PRIVACIDADE

Os resultados deste estudo serão alvo de tratamento estatístico e posterior inclusão em tese de Doutoramento, podendo ainda ser divulgados e publicados cientificamente; no entanto, a privacidade dos pacientes será sempre protegida uma vez que as identidades dos intervenientes não serão de forma alguma divulgadas.

ASSINATURAS

Este estudo foi discutido com o paciente e seu progenitor/ tutor e todas as questões colocadas foram esclarecidas. Quaisquer questões adicionais acerca do estudo deverão ser dirigidas aos investigadores enumerados anteriormente.

Concordo com os termos acima descritos e ficarei com uma cópia deste consentimento em meu poder.

Assinatura do progenitor/ tutor

Assinatura da criança se > 10 anos

Assinatura de testemunha

Assinatura do investigador

Data

4. Registo clínico

Data(s) registo(s):

Nº de registo:

Código de registo:

DENTIFICAÇÃO e CARACTERIZAÇÃO SOCIO-ECONÓMICA

1. Nome: 2. Idade: 3. Género: M / F 4. Residência: Rural / Urbana

5. Profissão da mãe/pai: 6. Nível de escolaridade da mãe/pai:

ANAMNESE GERAL

7. Distúrbios na gravidez: S / N

8. Prematuridade: S / N

9. Baixo peso ao nascer: S / N

10. Amamentação após 1 A: S / N

11. Outra patologia passada relevante: S / N

12. Medicações frequentes : S / N

13. Idade de diagnóstico:

14. Hipo/ hiperglicémias frequentes: S / N

15. Controlo metabólico HBA1C:

ANAMNESE DENTÁRIA

16- Erupção dentes temporários/ definitivos: Normal/ Precoce/ Tardia

17- Escova os dentes com pasta fluoretada: S / N/ Não sabe/ Não escova

18- Usa(ou) outro produto fluoretado para além do dentífrico? S / N/ Não sabe

19- Nº de escovagens diárias: Não escova/ 1x/ 2x/ >2x

20- Auxílio na higiene oral: S / N

21- Usa fio/ fita dentária: S / N

22- Dor de dentes prévia: S / N

23- Idade da 1ª consulta de MD

24- Medo do dentista/ má exp^a em consulta: S / N

25- Consulta no último ano? S / N

26- Hábitos de sucção após 3 A: S / N/ Não sabe

27- Tratamento ortodôntico? S / N

28- Respirador bucal: S / N/ Não sabe

29- Bruxismo: S / N/ Não sabe

30- Em caso de hipoglicémia nocturna, escova os dentes após ingestão de sacarose: S / N

HÁBITOS DIETÉTICOS

31- Número total de refeições diárias: 3/ 3-5/ + 5/ Não sabe

32- Entre as refeições principais ingere: Pão/ Bolachas/ Cereais/ Leite ou derivados/ Sumos/ Fruta

33- Bebida preferencialmente ingerida: Água/ Sumo de fruta/ Bebidas gaseificadas/ Outras

34- Consumo de doces: Raramente/ Frequente/ Muito frequente

4. Registo clínico (cont.)

REGISTO DENTÁRIO

Superior dto.

Superior esq.

			55	54	53	52	51	61	62	63	64	65				
Face	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
M																
O						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
D																
B																
L																

Inferior dto.

Inferior esq.

			85	84	83	82	81	71	72	73	74	75				
Face	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
M																
O						<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
D																
B																
L																

Códigos de restaurações e selantes	Códigos de cárie	Dentes ausentes
0 = não selado nem restaurado	0 = são	97 = perdido por cárie
1 = selado parcialmente	1 = alteração visual inicial no esmalte	98 = perdido por outra razão
2 = selado totalmente	2 = alteração distinta no esmalte	99 = não erupcionado
3 = restaurado com material estético	3 = fractura de esmalte, sem dentina visível	P = implante
4 = restaurado com amálgama	4 = sombra na dentina, sem cavitação	
5 = coroa metálica	5 = cavidade distinta com dentina visível	
6 = coroa ou ponte cerâmica ou metalocerâmica	6 = extensa cavidade com dentina visível	
7 = fractura ou perda de restauração		
8 = restauração provisória		

CONDIÇÃO PERIODONTAL

16	11	26
46	31	36

Códigos de registo periodontal - CPI

- 0 = são
- 1 = hemorragia espontânea ou à sondagem
- 2 = cálculos
- 3 = sextante excluído

OUTRAS LESÕES

- 1- Lesão aftosa/ ulcerativa 2- Fístula 3- Abscesso 4- Leucoplasia 5- Eritroplasia
- 6- Pigmentação negra extrínseca 7- Outras lesões Especificar:.....
- 8- Má oclusão Especificar:.....

5. Classificação das variáveis em estudo

Variáveis do estudo

VARIÁVEL	N - Nominal Q - Quantitativa O - Ordinal		TIPO
	CODIGO/VALOR		
Residência	1. Rural 2. Urbana		N
Gênero	1. M 2. F		N
Idade	1. 5-11 anos 2. ≥12 anos		O
Raça	1. Caucasiana 2. Negra 3. Outras		N
Nível de formação dos progenitores	1. Pai+ mãe sem formação superior 2. Pai + mãe com formação superior 3. Mãe com formação superior 4. Pai com formação superior		N
Prematuridade/BPN	1. Sim 2. Não		N
Amamentação após 1 ano de idade	1. Sim 2. Não		N
Outra patologia relevante pregressa	1. Sim 2. Não		N
Anos decorridos desde diagnóstico da DM	1. < 5 anos 2. ≥ 5anos		O
Hipo/ hiperglicémias + 2x/semana	1. Sim, + hiperglicemias 2. Sim, + hipoglicemias 3. Não 4. Ambas		N
Controlo metabólico HBA1c	1. Bom ≤7,5 2. Mau >7,5		O
Erupção dentária	1. Normal 2. Precoce 3. Tardia 4. Não sabe		N
Usa(ou) outro produto fluoretado que não dentífrico	1. Usa 2. já usou 3. Nunca usou 4. Não sabe		N
Frequência de escovagem dentária	1. <2x/dia 2. ≥ 2x/dia 3. Não escova		N
Auxílio na higiene oral	1. Sim 2. Não 3. Não escova		N
Usa fio/ fita dentária	1. Sim 2. Não		N
Dor de dentes prévia	1. Sim 2. Não		N
Idade da 1ª consulta de Medicina Dentária	1. ≤ 6 anos 2. >6 anos 3. Nunca foi 4. Não sabe		N
Medo do dentista/ má expª em consulta	1. Sim 2. Não		N
Hábitos de sucção depois dos 3 anos	1. Sim 2. Não 3. Não sabe		N
Usa/ já usou algum tipo de aparelho ortodôntico	1. Sim 2. Não		N
Respiração bucal	1. Sim 2. Não 3. Não sabe		N
Tem o hábito de ranger os dentes	1. Sim 2. Não 3. Não sabe		N
Em caso de hipoglicemia nocturna, escova os dentes após ingestão de sacarose?	1. Sim 2. Não 3. Nunca aconteceu		N
Número total de refeições diárias	1. ≤5 2. >5		O
Bebida preferencialmente ingerida	1. Água 2. Sumo sem gás 3. Sumo com gás 4. Outras		N
Consumo de guloseimas	1. ≤1x/ semana 2. 1-3 x/ semana 3. Diariamente		O
Índice CPO	1. 0 2. 1-4 3. >4 4. Não aplicável		O
Índice cpod	1. 0 2. 1-4 3. >4 4. Não aplicável		O

5. Classificação das variáveis em estudo (cont.)

Experiência de cárie	1. Em ambas as dentições 2. Apenas na dentição decídua 3. Apenas na dentição permanente 4. Sem experiência de cárie	N
Selantes de fissuras	1. Sim 2. Não	N
Traumatisms dentários	1. Sim, restaurado 2. Sim, não restaurado 3. Não	O
Condição periodontal	1. São 2. Hemorragia à sondagem 3. Sextante excluído/ Não aplicável	N
Má oclusão	1. Sim 2. Não	N
Outras lesões	1. Lesão aftosa/ ulcerativa 2. Fístula 3. Abscesso 4. Leucoplasia 5. Eritroplasia 6. Pigmentação negra extrínseca 7. Candidíase 8. Língua geográfica 9. Hipoplasia de esmalte 10. Outras 11. Sem qualquer lesão	N
Fluxo salivar estimulado	1. Normal: ≥ 1 ml/min 2. Baixo: < 1 ml/min 3. Sem saliva	O
Capacidade tampão da saliva	1. Alta capacidade tampão 2. Média capacidade tampão 3. Baixa capacidade tampão 4. Sem saliva	N
CRT bactéria	1. S. mutans e Lactobacillus $< 10^5$ 2. S. mutans e Lactobacillus $\geq 10^5$ 3. S. mutans $< 10^5$ e Lactobacillus $\geq 10^5$ 4. S. mutans $\geq 10^5$ e Lactobacillus $< 10^5$ 5. Sem saliva	N
Presença de leveduras	1. Saliva (presente na saliva, ausente na zaragatoa) 2. Esfregaço (presente na zaragatoa e ausente na saliva) 3. Saliva + esfregaço (presentes nos 2) 4. Sem leveduras (ausentes nos 2) 5. Presente na zaragatoa e ausência/ impossibilidade de tt de saliva 6. Ausente na zaragatoa e ausência de amostra/ impossibilidade de tt de saliva 7. Sem registo	N
Nº de espécies (saliva/esfregaço)	1. Apenas 1 espécie 2. + do que 1 espécie 3. Sem leveduras 4. Sem registo 5. Sem saliva	N
Tipos de espécies (saliva/esfregaço)	1. C. albicans 2. C. raliensis 3. C. dubliniensis 4. C. guilliermondi = Pichia guilliermondi 5. C. krusei = Pichia kudriavzevii 6. C. lipolytica 7. C. parapsilosis 8. C. zeylanoides 9. Saccharomyces cerevisiae 10. Hyphopichia burtonii 11. Wickerhamomyces anomalus 12. Torulaspora delbrueckii 13. Filobasidium capsuligenium 14. Candida albicans + Filobasidium capsuligenium 15. Sem leveduras 16. Sem registo 17. Debaryomyces hansenii	N
Carga de leveduras	1. ≤ 100 CFU/ml saliva ou esfregaço 2. ≥ 101 CFU/ml saliva ou esfregaço 3. Sem leveduras 4. Sem registo 5. Sem saliva	N

6. Identificação das espécies de leveduras

Amostra 25

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

>gi|284517589|gb|GU319992.1|

Candida albicans strain ATCC 14503 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=610

Score = 1067 bits (555), Expect = 0.0
Identities = 555/555 (100%), Gaps = 0/555 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTT 60
|||||
Sbjct 55 AGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTT 114

Query 61 GTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGAACAGGACGT 120
|||||
Sbjct 115 GTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGAACAGGACGT 174

Query 121 CACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGTCTGTGTAAGTTCCTTCGAC 180
|||||
Sbjct 175 CACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGTCTGTGTAAGTTCCTTCGAC 234

Query 181 GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAAT 240
|||||
Sbjct 235 GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAAT 294

Query 241 ATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAA 300
|||||
Sbjct 295 ATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAA 354

Query 301 AGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTAT 360
|||||
Sbjct 355 AGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTAT 414

Query 361 TTTGCATGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGA 420
|||||
Sbjct 415 TTTGCATGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGA 474

Query 421 GCGGCAGGATAATGGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTATTATAGCCTCTGAC 480
|||||
Sbjct 475 GCGGCAGGATAATGGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTATTATAGCCTCTGAC 534

Query 481 GATACTGCCAGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCT 540
|||||
Sbjct 535 GATACTGCCAGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCT 594

Query 541 TAAGTCGCCCGTCTT 555
|||||

6. Identificação das espécies de leveduras (cont.)

Sbjct 595 TAAGTCGCCCGTCTT 609

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

Nucleotide Nucleotide Search Limits Advanced Help

Display Settings: GenBank Send to: Change region shown Customize view

Candida albicans strain ATCC 14503 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: GU319992.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS GU319992 610 bp DNA linear PLN 31-JAN-2010
 DEFINITION Candida albicans strain ATCC 14503 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION GU319992
 VERSION GU319992.1 GI:284517589
 KEYWORDS .
 SOURCE Candida albicans
 ORGANISM [Candida albicans](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales; Candida.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 610)
 AUTHORS Gujjari,P., Suh,S.-O. and Zhou,J.
 TITLE ATCC Mycology Authentication Project
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 610)
 AUTHORS Gujjari,P., Suh,S.-O. and Zhou,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-DEC-2009) Mycology, American Type Culture Collection, 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110, USA

FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..610
 /organism="Candida albicans"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="ATCC 14503"
 /culture_collection="ATCC:14503"
 /db_xref="taxon:5476"
 rRNA <1..>610
 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN
 1 aacttaagca tatcaataag cggaggaaaa gaaaccaaca gggattgcct cagtagcggc
 61 gaggtaagcg gcaaaagctc aaattgaaa tctggcgtct ttggcgtccg agttgtaatt
 121 tgaagaaggt atctttgggc ccgctctgtg tctatgttcc ttggaacagg acgtcacaga
 181 gggtagaat cccgtgcgat gagatgaccc gggctctgtg aaagttcctt cgaagagtcg
 241 agttgttggg gaatgcagct ctaagtgggt ggtaaattcc atctaaagct aaatattggc
 301 gagagaccga tagcgaacaa gtacagtgat ggaagatga aaagaacttt gaaaagagag
 361 tgaaaaagta cgtgaaattg ttgaaagggg agggcttgag atcagaactg gtattttgca
 421 tgtgtctctc tcggggcgcg ccgctgcggt ttaccgggcc agcatcggtt tggagcggca
 481 ggataatggc ggaggaaagt ggcacggctt ctgctgtgtg ttatgcctc tgacgatact
 541 gccagcctag accgaggact gcggttttta cctaggatgt tggcacaatg atcttaagtc
 601 gccgctcttg
 //

You are here: NCBI > DNA & RNA > Nucleotide Database Write to the Help Desk

GETTING STARTED NCBI Education NCBI Help Manual NCBI Handbook Training & Tutorials	RESOURCES Chemicals & Bioassays Data & Software DNA & RNA Domains & Structures Genes & Expression Genetics & Medicine Genomes & Maps Homology Literature Proteins Sequence Analysis Taxonomy Training & Tutorials Variation	POPULAR PubMed Nucleotide BLAST PubMed Central Gene Bookshelf Protein OMIM Genome SNP Structure	FEATURED Genetic Testing Registry PubMed Health GenBank Reference Sequences Map Viewer Human Genome Mouse Genome Influenza Virus Primer-BLAST Sequence Read Archive	NCBI INFORMATION About NCBI Research at NCBI NCBI Newsletter NCBI FTP Site NCBI on Facebook NCBI on Twitter NCBI on YouTube
---	--	---	--	---

Copyright | Disclaimer | Privacy | Accessibility | Contact
 National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

