

Fluxo salivar e concentração do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) na saliva de pacientes diabéticos tipo 2

Salivary flow and Epidermal Growth Factor (EGF) levels in saliva of type 2 diabetic patients

Monique Danyelle Emiliano Batista Paiva¹ Amanda Maria Medeiros de Araujo² Márcia Regina Piuvezam³ Hermann Ferreira Costa⁴ Lino João da Costa⁵

¹ Doutora em Estomatologia (UFPB/UFBA)

² Mestranda em Radiologia Odontológica na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP/SP)

³ Doutora em Imunologia (UFRJ) e Pós-Doutorado (Department of Immunology, University of Strathclyde, Escócia)

⁴ Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (UFPB)

⁵ Doutor em Odontologia - Diagnóstico Bucal (USP). Professor de Estomatologia (UFPB)

DESCRIPTORIOS:

Saliva; Fator de Crescimento Epidérmico; Diabetes Mellitus.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o fluxo salivar e a concentração do EGF na saliva de pacientes diabéticos, comparados a um grupo controle de pacientes clinicamente saudáveis. A amostra foi composta de 15 indivíduos divididos em dois grupos, G0 – controle (n=9) e G1 – diabéticos (n=6). A saliva foi coletada por estimulação mecânica com o auxílio de um hiperboloide. A concentração do EGF foi verificada por meio de imunensaio do tipo sanduíche, com a utilização de Kit ELISA (R&D Systems®) e auxílio de um leitor de microplaca. Pôde-se observar uma média do fluxo salivar de 1,27 ml/min. no G0 e 1,26 ml/min. no G1, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, quando empregado o teste t-Student (p=0,972). Quanto ao EGF, foram observadas as médias de 1624,08 pg/ml e 2367,66 pg/ml para o G0 e G1, respectivamente, também não sendo esta diferença significante (p=0,559). Os dados deste trabalho demonstraram que não houve diferenças significativas do fluxo salivar e da concentração de EGF na saliva dos pacientes diabéticos em relação ao grupo controle.

Keywords:

Saliva; Epidermal Growth Factor; Diabetes Mellitus.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the salivary flow and the concentration of EGF in saliva of diabetic patients not insulin-dependents compared with a non diabetic patients (control group). Stimulated saliva was collected in two groups of patients: G0 – control (n=9) and G1 – diabetics (n=6), using a hiperbolóide. Saliva was expelled in the first minute and it was despised. In the following five minutes it was collected with a funnel connected to a graduated tube. EGF concentration measurement was performed using a sandwich-type immunoassay, using an ELISA Kit (R&D Systems®) and a microplate reader. It was observed an average of salivary flow of 1.27ml/min. in G0 and 1.26ml/min. in G1 and it was not found significant differences between the two groups (p=0.972). It was also observed an average of 1624.08 pg/ml of EGF in the G0 and 2367.66 pg/ml in the G1 and as the salivary flow the difference was not statistically significant (p=0.559). The data present in this work demonstrate no differences between salivary flow and EGF concentration of diabetic patients as compared as non-diabetic patients.

235

Endereço para correspondência

Monique Danyelle Emiliano Batista Paiva
Rua Tertuliano de Castro, 101/303 - Bessa - João Pessoa/PB - CEP: 58035-170
Email: monique_batista@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a prevalência de diabetes é de mais de 180 milhões de pessoas no mundo, com incidência crescente em curso, podendo duplicar até 2030¹. O comprometimento da cicatrização de feridas em diabéticos se deve a alterações no sistema imunológico e defeitos inflamatórios inerentes ao Diabetes Mellitus^{2,3}.

Ao longo das últimas décadas, os fatores de crescimento têm sido testados pela sua capacidade de acelerar o processo de cicatrização, na tentativa de sobrepor as alterações apresentadas pelos indivíduos diabéticos².

Hormônios peptídicos salivares, como o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF do inglês Epidermal Growth Factor), estão envolvidos na regulação de processos inflamatórios e na promoção da proliferação celular, contribuindo para uma rápi-

da cicatrização de feridas no epitélio⁴. O EGF é conhecido por estimular a replicação de fibroblastos, aumentar a produção de colágeno, resultando em uma maior formação de epitélio².

É uma proteína composta por 53 aminoácidos, potencialmente mitogênica. Está presente nos fluidos biológicos, incluindo a saliva, e possui importante papel na manutenção de uma barreira epitelial protetora e na cicatrização da mucosa quando esta é agredida^{5,6}, estimulando a proliferação das células da mucosa oral⁴.

O EGF da saliva origina-se das glândulas parótida e submandibular⁷, e sua concentração parece estar reduzida em pacientes tabagistas⁸. A glândula parótida é a principal fonte de EGF na saliva humana⁹. A proporção relativa de EGF nas glândulas parótida, submandibular e no restante das glândulas é de 6:4:1¹⁰.

O objetivo deste trabalho foi o de aprofundar os estudos, avaliando o fluxo salivar e a concentração do EGF na saliva de pacientes diabéticos, que, devido a essa condição, já apresentam dificuldades na cicatrização, quando comparados a pacientes saudáveis.

METODOLOGIA

PACIENTES

Fizeram parte da amostra 15 indivíduos, divididos em dois grupos: G0 – controle, composto de 9 indivíduos saudáveis e G1 – diabéticos tipo 2, com 6 indivíduos não dependentes de insulina.

COLETA DA SALIVA

A saliva total estimulada foi obtida por meio de estimulação mecânica, baseada na técnica de Krasse¹¹, modificada quanto ao material utilizado, de forma que o paciente foi orientado a mastigar o hiperboloide durante um minuto, deglutindo a saliva. Após o primeiro minuto, foi acionado um cronômetro, e este continuou mastigando, porém sem deglutir a saliva, a qual era expelida em funil de vidro de onde seguia para um tubo graduado, em intervalos frequentes de 1 minuto, durante cinco minutos.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EGF

Uma vez coletada, a saliva foi centrifugada durante 10 minutos a uma velocidade de 4000 rpm para sedimentação de bactérias, células epiteliais, restos nucleares e outros detritos. O sedimentado foi desprezado, e o sobrenadante foi, então, congelado em um freezer a -80°C, até o momento do imunoensaio. A análise da saliva para medição da concentração do EGF foi realizada por meio de um imunoensaio do tipo sanduíche, com a utilização de um Kit ELISA (R & D Systems[®]). A concentração de EGF foi expressa pela leitura de densidade óptica das amostras em comparação com uma curva padrão, com o auxílio de um leitor de microplaca com absorção de 450nm, seguida de 570 nm de comprimento de onda. As amostras foram submetidas ao ensaio em duplicata.

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Todos os indivíduos pertenciam a uma faixa etária de 40 a 70 anos, sendo 12 do gênero feminino e 3 do masculino. Quanto à etnia, 12 eram não-caucasianos, e 3, caucasianos. Nenhum possuía os hábitos de tabagismo ou tabagismo.

FLUXO SALIVAR E CONCENTRAÇÃO DO EGF

Foram observadas as seguintes médias de fluxo salivar

para os grupos G0 e G1, respectivamente: 1,27 ml/min e 1,26 ml/min, não sendo observada diferença estatisticamente entre os dois grupos ($p=0,972$). A média da concentração de EGF foi de 1624,08 pg/ml no grupo G0 e 2367,66pg/ml no grupo G1, também não sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,559$), (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição do fluxo salivar (ml/min.) estimulado e da concentração do EGF (pg/ml), segundo os grupos.

Variáveis	Grupo			Valor de p
	Estadísticas	Controle	Diabetes	
FLUXO SALIVAR (ml/min)	Nº de observações	9	6	$p=0,972^*$
	Média	1,27	1,26	
	Mediana	1,30	1,15	
	Desvio-Padrão	0,39	0,71	
	Mínimo	0,60	0,40	
	Máximo	1,90	2,40	
CONCENTRAÇÃO DO EGF (pg/ml)	Nº de observações	9	6	$p=0,559^*$
	Média	1624,08	2367,66	
	Mediana	1544,72	1225,26	
	Desvio-Padrão	638,81	2879,71	
	Mínimo	612,98	966,44	
	Máximo	2929,10	8226,38	

*Quando aplicado o Teste t-Student.

DISCUSSÃO

O Diabetes Mellitus tipo 2, também chamado diabetes mellitus não dependente de insulina, é a quinta condição crônica mais comum e a sexta maior causa de mortalidade entre os idosos¹².

Alterações nos níveis de insulina bem como de glicose no sangue são fatores que afetam diretamente a capacidade das glândulas salivares para sintetizar proteínas específicas¹³. Desde a descoberta do EGF nas glândulas salivares, avanços foram feitos no conhecimento do estudo da biologia celular e saúde das ciências orais¹⁴.

Os fatores de crescimento presentes na saliva desenvolvem um importante papel no reparo dos tecidos moles da cavidade oral⁷ e na regulação do crescimento celular bem como proliferação e diferenciação⁸. Trabalhos realizados recentemente provaram a ação de reparação tecidual do EGF^{4, 6, 7, 12, 14} em diabéticos^{2, 13, 15, 16, 17}.

Estudos referem a importância do EGF na proteção da mucosa oral, sendo também possível localizar, na literatura, citações, principalmente em relação ao seu efeito protetor em nível gastrointestinal¹⁸ e na mucosa do trato alimentar superior, no tratamento de colites e úlceras gastrointestinais^{18, 19, 20}.

Tem havido uma compreensão mais profunda da farmacologia de fatores de crescimento que visa ao reforço do processo de cicatrização^{15, 21, 22}. Particularmente em pacientes diabéticos, a cicatrização de feridas após cirurgias é frequentemente comprometida. Também é comum a experiência de ulceração crônica das extremidades^{13, 15}. Por isso, a redução dos níveis do EGF na saliva pode ajudar a explicar a presença de complicações orais e sistêmicas na cicatrização de feridas associadas com o diabetes^{2, 13, 16}.

Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre fluxo salivar e concentração do EGF entre pacientes saudáveis e diabéticos não insulino-dependentes, o que difere dos achados de Oxford¹³, que encontrou diferença estatística nessas variáveis, sendo menores as concentrações em pacientes diabéticos.

Sugerimos a necessidade de novos estudos com maior número amostral que possam contribuir para novas descobertas na área do diabetes e dos fatores de crescimento, de maneira a proporcionar melhoria da qualidade de vida dos pacientes portadores dessa patologia crônica, melhorando os processos de reparo e regeneração tecidual nestes.

CONCLUSÃO

Conclui-se não haver diferenças quanto ao fluxo salivar e à concentração do EGF na saliva dos pacientes diabéticos tipo 2 estudados em relação ao grupo controle de indivíduos sem distúrbios sistêmicos.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Diabetes: World Health Organization Fact Sheet. 2008; 312.
2. Dogan S, Demirel S, Kepenekci I, Erkek B, Kiziltay A, Hasirci N, et al. Epidermal growth factor-containing wound closure enhances wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *Int Wound J* 2009; 6:107-15
3. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 2005; 23: 594-608.
4. Groschl M. The physiological role of hormones in saliva. *Bio-Essays* 2009, 31: 843-52.
5. Epstein JB, et al. The correlation between growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. *Cancer*. 2000; 89(11): 2258-65.
6. Ohshima M, et al. Physiologic levels of Epidermal growth factor in saliva stimulate cell migration of an oral epithelial cell line, HO-1-N-1. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 130-6.
7. Dumbrigue HB, et al. Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 2000; 89(6): 710-6.
8. Konturek JW, et al. Distribution and release of epidermal growth factor in man. *Gut* 1989; 30(9): 1194-200.
9. Thesleff I, Viinikka L, Saxen L, Lehtonen E, Perheentupa J. The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. *Life Science* 1988; 43(1): 13-8.
10. Ino M, Ushiro K, Yamashita T, Kumazawa T. Kinetics of epidermal growth factor in saliva. *Acta Otolaryngol Suppl* 1993; 500:126-30.
11. Krasse B. Risco de cáries - Guia prático para controle e assessoramento. 2 ed. São Paulo: Quintessence, 1988, 113p.
12. Lima DC, Nakata GC, Balducci I, Almeida JD. Oral manifestations of diabetes mellitus in complete denture wearers. *The J Prosthetic Dentistry* 2008; 99(1): 60-5.
13. Oxford GE, Tayari L, Barfoot MD, Peck AB, Tanaka Y, Humphreys-Beher MG. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *J Diabetes and its complications*. 2000; 14: 140-5.
14. Mori M, Sumimoto S, Shrestha P, Tanaka S, Takai Y, Shikimori M. Multifunctional roles of growth factors or biologically active peptides in salivary glands and saliva. *Oral Med Pathol* 2008; 12: 115-23.
15. Acosta JB, Savigne W, Valdez C, Franco N, Alba JS, del Rio A, et al. Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds. *Int Wound J* 2006; 3:232-9.
16. Lee HY; Yea K, Kim J, Lee BD, Chae YC, Kim HS, et al. Epidermal growth factor increases insulin secretion and lowers blood glucose in diabetic mice. *J Cell Mol Med* 2008; 12(5A): 1593-604.
17. Akhtar S, Almubrad T, Bron AJ, Yousif MHM, Benter IF, Akhtar S. Role of epidermal growth factor (EGFR) in corneal remodeling in diabetes. *Acta Ophthalmologica* 2009; 1-9.
18. Guglietta A, Sullivan PB. Clinical applications of epidermal growth factor. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7(10); 945-50.
19. Maccini DM; Veit BC. Salivary epidermal growth factor in patients with and without acid peptic disease. *Am J Gastroenterol* 1990; 85(9): 1102-4.
20. Sarosiek J, et al. Salivary and gastric epidermal growth fac-

tor in patients with Zollinger-Ellison Syndrome: its protective potential. *AJG* 2000; 9(5): 1158-65.

21. Dagogo-Jack, S., Epidermal growth factor EGF in human saliva: effect of age, sex, race, pregnancy, and sialogogue. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986; 124: 47-54.

22. Playford RJ, Wright NA. Why is epidermal growth factor present in the gut lumen? *Gut* 1996; 38:303-5.