



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

A SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO

Trabalho submetido por

Ana Sofia Teixeira Gonçalves

Para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Professora Doutora Carla Ascenso

Novembro de 2015

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meus pais, ao meu irmão e
à minha cunhada que foram porto seguro perante as
dificuldades deste percurso.

E a ti, Sofia!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, por me terem ajudado a chegar até aqui, por terem permitido a realização de um sonho. Por nunca me deixarem desistir, pelo carinho e apoio, o meu “Muito Obrigada”. Sem vocês nada disto teria sido possível!

Agradeço ao meu irmão por todas as palavras, por ter confiando sempre em mim e nas minhas capacidades e pelo brilho no olhar de orgulho em mim! Obrigada, és sem dúvida o homem mais importante da minha vida!

Sem preferência, um agradecimento à minha tia Odília, à minha cunhada, ao meu primo Hugo, à Irina, à minha avó, à Lena. Sem vocês este percurso não teria o sabor que teve. À restante família que sempre me quis bem, obrigada por tudo!

À Bruna por toda a cumplicidade neste último ano, por todas as partilhas, por todos os segredos, pelos sorrisos, pelas lágrimas, pelos conselhos, pelos “puxões de orelha”, pela amizade que construímos! Nunca me falhaste, estiveste sempre quando mais precisei, gosto mesmo muito de ti! Muito Obrigada por tudo, levo-te comigo para toda a vida!

À Sofia, minha querida Sofia. Minha guerreira, meu exemplo, minha amiga! Obrigada por me teres dito, TODOS OS DIAS, que eu era capaz, que eu ia conseguir. Por me fazeres acreditar mais em mim, nos meus valores, nas minhas capacidades! Estaremos sempre juntas!

Sem mencionar nome algum, aos meus colegas da faculdade pelos momentos partilhados!

À Carla e ao Francisco – “Os amigos são como as estrelas, nem sempre os vemos mas sabemos que estão sempre lá”.

Resumo

A procura, em tempo útil, de ferramentas de diagnóstico eficazes em termos de custos, com elevada precisão e sensibilidade, e procurando que sejam não-invasivas, é uma área que tem sido alvo de muitos estudos por parte dos investigadores. Detetar patologias nos seus estados iniciais pode melhorar: o seu prognóstico, a eficácia da terapêutica, a taxa de sobrevivência, entre outros.

O rastreio, o diagnóstico e monitorização de várias doenças implica procedimentos invasivos, dolorosos, como é o caso da colheita de sangue e das biópsias.

Há vários anos que a saliva tem mostrado ser um bom meio para diagnóstico e monitorização tanto da doença como da terapêutica. São várias as vantagens que este fluido biológico apresenta em relação ao soro: colheita não-invasiva (não dolorosa) e mais segura (não há utilização de agulhas), não requer profissionais especializados, a sua manipulação, transporte e armazenamento são procedimentos fáceis e permite a colheita em qualquer indivíduo, seja ele pediátrico, adulto ou geriátrico.

Um conhecimento aprofundando dos constituintes salivares, tanto quantitativos como qualitativos, é fundamental para a tornar possível a identificação de biomarcadores salivares caraterísticos de determinada doença.

Este trabalho teve como objetivo geral a apresentação da saliva como potencial meio de diagnóstico utilizando a análises das proteínas como ferramenta promissora no diagnóstico e monitorização da Diabetes Mellitus, do Cancro da Mama e da Polineuropatia Amiloidótica Familiar.

Palavras-chave: Biomarcadores; Diagnóstico; Proteína; Saliva.

Abstract

The search for useful diagnose tools on time, concerning costs, with high precision and sensitivity, and trying that they are non-invasive, is an area that has been largely studied by investigators. Detecting pathologies in their early stages can improve: the prognostic, the treatment effectiveness, and survival ratio, among others.

The screening, diagnose and monitoring of various diseases imply procedures that are invasive, painful, such as the blood collection or biopsies.

For many years, saliva has been given proof to be a good diagnose and monitoring mean for the disease and for the treatment. There are several advantages that this biological fluid presents regarding sorus: non-invasive collection (non-painful), it is safer (avoiding the use of needles), it does not require specialized professional, its easy manipulation, transportation and storage, it is possible to collect from any individual (children, adult or elder).

A deep knowledge of the saliva constituent, qualitative and quantitative, is fundamental in order to identify saliva biomarkers of specific diseases.

The present work main goal is the presentation of saliva as a potential diagnose mean by using protein analysis as a promising tool in the diagnose and monitoring of Mellitus Diabetes, Brest Cancer and Transthyretin-related hereditary amyloidosis.

Keywords: Biomarkers; Diagnostic; Protein; Saliva.

Índice

Índice de figuras.....	13
Índice de tabelas.....	14
Lista de Abreviaturas.....	15
CAPÍTULO I – Introdução.....	17
CAPÍTULO II – Características Gerais da Saliva.....	19
1. As Funções da Saliva.....	20
2. O Proteoma Salivar.....	21
3. A passagem de Biomoléculas do Sangue para a Saliva.....	28
CAPÍTULO III – A Saliva e a Análise Proteómica.....	29
1. A Saliva como Meio de Diagnóstico e de Monitorização.....	29
2. A Análise Proteómica como Ferramenta de Diagnóstico e de Monitorização.....	31
3. Biomarcadores Salivares.....	34
CAPÍTULO IV – Os Biomarcadores Salivares e as Doenças.....	37
1. Diabetes Mellitus.....	38
1.1. Diabetes Mellitus e a Análise Proteómica.....	39
2. Cancro de mama.....	48
2.1. Cancro de mama e a Análise Proteómica.....	49
3. Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF).....	52
3.1. Polineuropatia Amiloidótica Familiar e a Análise Proteómica... 54	
CAPÍTULO V – Conclusão.....	57
Bibliografia.....	59
Anexos.....	69

Índice de figuras

Figura 1: Localização das Glândulas Salivares Principais (Adaptado de Wong, 2006).....	19
Figura 2: As funções da Saliva. (Adaptado de Malathi, Mytulhi and Vasanthi, 2014).....	20
Figura 3: Diagrama de Veen (Adaptado de Yan, Apweiler and Balgley, 2009).....	22
Figura 4: Proteoma Salivar Humano Saudável (<i>Pfaffe et al., 2011</i>)	27
Figura 5: Mecanismos de transporte de biomoléculas do soro para os ductos das glândulas salivares. ¹	28
Figura 6: Vantagens e desvantagens da saliva como meio de diagnóstico em relação ao soro. Adaptado de Rahim et al. 2015	30
Figura 7: Metodologias diferentes que podem ser combinadas na Análise Proteômica (Barbosa et al., 2012)	32
Figura 8: Áreas que utilizam a análise proteômica salivar (Malathi, Mythili, and Vasanthi 2014).....	37
Figura 9: Sintomas de Hiperglicemia. Adaptado de (Association American Diabetes, 2015).....	38
Figura 10: Proteoma Salivar de doentes com Diabetes Mellitus Tipo II (Rao et al. 2009).....	40
Figura 11: Comparação dos resultados obtidos com os resultados de outros estudos realizados em diabéticos (Border et al., 2012)	43
Figura 12: Validação em Western blot da AMY-1 como biomarcador salivar de DM (Border et al 2012)	45
Figura 13: Resumo dos Potenciais Biomarcadores Salivares de DM	48
Figura 14: Diagrama de Venn	50
Figura 15: Manifestações clínicas da Polineuropatia Amilóide Familiar.....	53
Figura 16: Resultados do estudo Guerreiro, 2010	54

Índice de tabelas

Tabela 1: Função das Proteínas Salivares, em percentagem (adaptado de Massimo Castagnola et al, 2011)	23
Tabela 2: Principais proteínas presentes na saliva, as percentagens, a origem, as glândulas secretórias e a suas funções – Parte I (adaptado de Pfaffe et al. 2011).....	24
Tabela 3: Principais proteínas presentes na saliva, as percentagens, a origem, as glândulas secretórias e a suas funções – Parte II (adaptado de Pfaffe et al. 2011).....	25
Tabela 4: Principais proteínas presentes na saliva, as percentagens, a origem, as glândulas secretórias e a suas funções – Parte III (adaptado de Pfaffe et al. 2011)	26
Tabela 5: Principais proteínas presentes na saliva, as percentagens, a origem, as glândulas secretórias e a suas funções – Parte IIV (adaptado de Pfaffe et al. 2011).....	27
Tabela 6: Funções das Proteínas Cistatina C, LEI e UTER. (Adaptado de Rao et al., 2009).....	40
Tabela 7: Resumo dos estudos – Parte I	46
Tabela 8: Resumo dos Estudos - Parte II.....	47
Tabela 9: Resumo dos Estudos	52

Lista de Abreviaturas

1-DE – 1 *Dimension Eletrophoresis*

2-DE – 2 *Dimension Eletrophoresis*

A1T1 – α -1 antitripsina

A2MG – α -2 macroglobulina

AMY-1 – α -amilase 1

CYTN – Cistatina N

CYTS – cistatina S

DIGE – *Difference gel eletrophoresis*

ESI – *Eletrospray Ionization*

GADPH – gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

HPLC – *High performance liquid chromatography*

IEF – *Isoelectric focusing*

Ig – Imunoglobulina

IL β 1 – Interleucina β 1

IMS – *Imaging Mass Spectrometry*

LC – Cromatografia líquida

MALDI – *Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization*

MMP – Metaloproteinase

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro

MS – *Mass spectrometry*

PAGE - *Polyacrylamide gel electrophoresis*

PIP – Proteína indutora de prolina

PRPs – Proteínas Ricas em Prolina

RBP4 – Proteína de ligação ao retinol 5

RP – *Reversed phase*

PAF – Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF)

SAA – Amiloide A do soro

SDS - *sodium dodecyl sulfate*

SELDI – *Surface-Enhanced Laser Desorption/ionization*

TrFE – serotransferrina

TTR – transtirretina

CAPÍTULO I – Introdução

Há muito tempo que o ser humano anseia na melhoria da qualidade de vida, sempre com o objetivo de aproveitarmos ao máximo esta dádiva que é a Vida. Esta melhoria passa por vários domínios: domínio da saúde física, o domínio psicológico, o grau de independência, as relações sociais, o meio envolvente e ainda as crenças pessoais e espirituais. (Grad, 2002) No âmbito da melhoria da qualidade de vida entra o papel do farmacêutico como profissional de saúde. (Organización Mundial de la Salud., 1993) O farmacêutico tem um papel importante na sociedade portuguesa que se traduz em funções como: o aconselhamento do uso racional do medicamento, a monitorização do doente, a sensibilização para um estilo de vida mais saudável e na capacidade de despistar de forma precoce algumas doenças, identificando sinais de alerta. (Faria, 2015)

Muitas doenças iniciam-se silenciosamente, o que leva a um difícil diagnóstico e muitas vezes tardio, devido há ausência de sintomatologias. São doenças com grande impacto global como doenças oncológicas, cardiovasculares, metabólicas e neurológicas que necessitam de um método alternativo à metodologia praticada, com o objetivo de se conseguir um diagnóstico precoce. Atualmente, sabe-se que este diagnóstico permite, de certa forma, aumentar a resposta à terapêutica, diminuir impactos graves na vida do doente, retardar complicações da doença e, assim, aumentar também a taxa de sobrevivência. (A. Zhang et al., 2013) (Lee & Wong, 2009)

Um bom meio de diagnóstico este deve ser altamente sensível, com elevada especificidade, portabilidade e de baixo custo. A saliva tem revelado um bom meio para diagnósticos precoces, assim como, para monitorização da doença e da terapêutica. Este fluido biológico tem atraído muitos investigadores, devido às suas características que o tornam único e importante, como o caso da baixa capacidade de invasão e consequente baixo risco de infeção, custo mínimo, colheita fácil e sem necessidade de recorrer a profissionais especializados. O processamento, o transporte e a armazenagem são processos simples. (A. Zhang et al., 2013) (Wong, Shen Hu, Joseph A. Loo, 2010)

Neste sentido, os diagnósticos salivares são uma área promissora que está em constante desenvolvimento com o objetivo de ser integrada, num futuro próximo, como parte do diagnóstico, monitorização e para tomadas de decisões clínicas importantes no combate a diversas doenças. (Rodriguez-Chavez & R., 2012)

Esta monografia tem como objetivo geral a apresentação da saliva como meio de diagnóstico utilizando a análise proteômica como ferramenta promissora no diagnóstico salivar de algumas doenças sistêmicas.

CAPITULO II – Caraterísticas Gerais da Saliva

A Saliva é um líquido aquoso, composto por água, eletrólitos e enzimas. É uma secreção glandular formada a partir de três pares de glândulas salivares principais: a parótida, a submandibular e a sublingual, e ocorre em duas fases: a primeira fase denomina-se acinar e a segunda ductal. Na primeira fase há secreção da saliva isotônica a partir das células acinares. Na segunda fase ocorre modificações da saliva inicial: há absorção de sódio e cloro e secreção de potássio e bicarbonato. Uma vez que as células ductais são impermeáveis à água, esta não é absorvida tal como o soluto, tornando-a assim hipotônica. (Acevedo, 2012) (Constanzo, 2014)

A figura 1 apresenta a localização das glândulas salivares principais, descritas anteriormente.

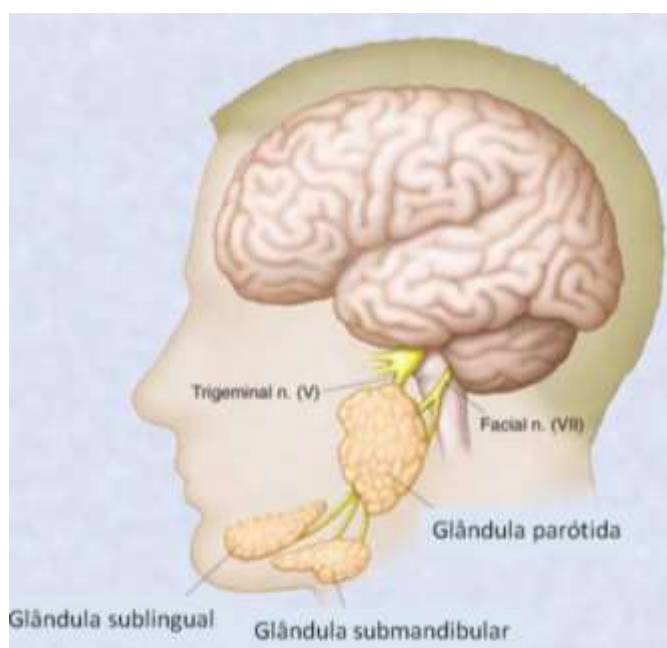


Figura 1: Localização das Glândulas Salivares Principais (Adaptado de Wong, 2006)

O pH da saliva é cerca de 6,7, contudo este sofre constantemente alterações. Desta forma, é importante que esta possua um sistema tampão, como no caso do sistema bicarbonato, que evita, por exemplo, a desmineralização do esmalte dos dentes e as agressões na mucosa. Um teor de ureia significativo é capaz de reverter as alterações provocadas no pH fisiológico. (Acevedo, 2012)

1. As Funções da Saliva

São múltiplas as funções que a saliva apresenta. A figura 2 representa a esquematização destas funções.



Figura 2: As funções da Saliva. (Adaptado de Malathi, Mytulhi and Vasanthi, 2014)

Uma das principais funções das glândulas salivares é manter um fluxo salivar contínuo para que a cavidade oral fique sempre húmida. Isto deve-se em grande parte, ao facto da saliva conter grandes quantidades de mucinas, ou seja, agentes lubrificantes que permitem controlar a adesão, e a eliminação de microrganismos, células, leucócitos e restos de comida durante a deglutição. (M Castagnola et al., 2011) (Acevedo, 2012) Os agentes lubrificantes contribuem ainda para a proteção da cavidade oral, uma vez que auxiliam na defesa à desidratação e na manutenção salivar, na mastigação, na fala e na deglutição. (De Almeida, Grégio, Machado, De Lima, & Azevedo, 2008) Na porção aquosa da saliva está presente a amilase salivar. Esta tem como função principal a digestão do amido, convertendo-o em maltose e isomaltose, sendo que esta proteína será abordada, mais aprofundadamente, mais à frente.

A saliva tem papel fundamental no sistema imunitário do organismo. Estão presentes na saliva inúmeras proteínas de defesa, incluindo: as imunoglobulinas salivares e as chaperonas HSP70/HSPA, sendo que estas fazem parte da imunidade inata e da adquirida; ao contrário das lisozimas, a amilase salivar, as cistatinas, as proteínas ricas em prolina (PRPs), as mucinas, as peroxidases, entre outras, que são as principais responsáveis pela imunidade inata. Embora algumas destas proteínas estejam presentes na saliva em baixas concentrações, os seus efeitos de defesa não deixam de ser eficazes, uma vez que têm efeitos cumulativos e/ou sinérgicos, levando à formação de uma rede de defesa molecular eficaz e à formação de micelas salivares que permitem um enriquecimento das proteínas de defesa.

O sistema simpático e o sistema parassimpático são responsáveis pela secreção salivar, tendo este último um papel mais significativo. São muitos os estímulos que podem levar ao aumento ou diminuição da secreção salivar, devido aos núcleos salivares do tronco cerebral se encontrarem aumentados ou diminuídos, através de potenciais de ação emitidos pelas fibras parassimpáticas dos nervos cranianos facial (VII) e glossofaríngeo (IX). (Tate, P.; Seeley, R.; Stephens, 2011)

2. O Proteoma Salivar

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nos sistemas biológicos e desempenham um papel importante em quase todos os processos biológicos, incluindo o apoio estrutural, a catálise, a regulação, a defesa e a transmissão de sinal. O facto das proteínas possuírem uma estrutura tridimensional funcional única, permite que estas desempenhem uma diversidade de funções distintas, essenciais na maior parte dos processos biológicos dos seres vivos. (Quintas et al., 2008) (Gupta, Govila, & Saini, 2015)

A palavra “proteoma” deriva da fusão de duas outras palavras: “proteína” e “genoma” e foi introduzido em 1986 pela primeira vez por Mark Wilkins. Como primeira definição, em 1997, o proteoma referia-se à proteína total complementar que era capaz de ser codificada por um determinado genoma. Hoje em dia, uma das definições propostas para o conceito de proteoma é um conjunto total de proteínas de uma determinada célula, incluindo as suas alterações que variam com o tempo e com requisitos específicos ou em “*stress*” que uma célula ou organismo pode sofrer. (Humphery-Smith, 2015)

Associado a estes termos, surge em 1997 o termo “proteómica”, definindo-se como o estudo de todo o conjunto de proteínas expressas por um organismo de um dado ambiente e numa fase específica do ciclo celular. Um estudo completo da proteómica envolve a distribuição, as funções, a abundância, a interação das proteínas com outras macromoléculas e suas modificações pós-traducionais. (Häkkinen, Uitto, & Larjava, 2000)

Nos últimos anos, a análise proteómica tem tido um crescente interesse, com o objetivo de caracterizar qualitativamente e quantitativamente o conteúdo do proteoma. (Scarano et al., 2010) Neste sentido, a pesquisa proteómica vem aumentar a nossa compreensão do comportamento celular, estudando os diferentes padrões de conteúdo da proteína, a sua atividade e as suas variações durante o desenvolvimento ou resposta no

processo da doença. A proteômica também introduziu a possibilidade de permitir a identificação de novos fármacos e desenvolvimento de novos marcadores de diagnóstico para algumas doenças em causa.(Gupta et al., 2015)

O primeiro passo para, mais tarde, se utilizar a proteômica como meio de diagnóstico, monitorização da saúde em geral, identificação da patogénese e a própria saúde oral, passa pela análise abrangente e pela identificação de todo o conteúdo do proteoma salivar.

O proteoma salivar é composto por, aproximadamente, 30% de proteínas que também fazem parte do sangue e em ambos as proteínas mostram diversidade funcional comparável e ligação a determinadas doenças. O conhecimento aprofundado acerca do proteoma salivar é fundamental para entender as múltiplas funções que as proteínas podem ter, bem como descobrir biomarcadores que permitam melhorar o diagnóstico e monitorização da doença. (A. Zhang et al., 2013) (Malathi, Mythili, and Vasanthi, 2014)

A figura 3 representa o diagrama de Veen que demonstra o número de proteínas que pertencem à saliva total e à saliva das glândulas parótida, sublingual e submandibular, e ao plasma.

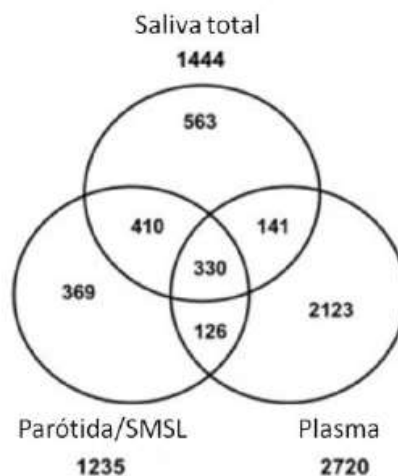


Figura 3: Diagrama de Veen (Adaptado de Yan, Apweiler and Balgley, 2009)

A primeira base de dados do mundo que centraliza os dados da proteômica denomina-se *Salivary Proteoma Knowledge Base* (www.skb.ucla.edu). Nesta base de dados estão todas as proteínas, até a data, identificadas, sendo acessível ao público em geral. Atualmente, já foram identificadas mais de 2400 proteínas salivares, mas este não é um número final. Espera-se que, num futuro próximo e com a contínua análise deste

proteoma, este número aumenta. (Pfaffe, Cooper-White, Beyerlein, Kostner, & Punyadeera, 2011)

Como referido anteriormente, as proteínas podem desempenhar múltiplas funções consoante o ambiente em que estão, sendo necessário uma análise cuidadosa para a atribuição destas funções. A tabela 1 demonstra as funções das proteínas salivares em percentagem.

Tabela 1: Função das Proteínas Salivares, em percentagem (adaptado de Massimo Castagnola et al, 2011)

Função	%
Imunidade	21%
Replicação de proteínas e reparação	1,6%
Mobilidade celular e secreção	4,8%
Transcrição e ribossomas	2,3%
Multiplicação e ciclo celular	4,2%
Transdução do sinal	9,7%
Metabolismo com o citoesqueleto	5,2%
Metabolismo com a endomembrana	7,1%
Proteínas incertas	28,7%
Proteínas com função desconhecida	15,4%

São muitas as classes de proteínas que existem e são classificadas como polimórficas. O facto de serem polimórficas pode ser uma desvantagem na análise da composição da saliva, uma vez que este conduz a uma grande variabilidade interindividual entre composições. É importante determinar se alguns dos polimorfismos específicos estão relacionados com condições patológicas ou suscetibilidade para determinada doença. (Tiziana Cabras et al., 2009) (Massimo Castagnola, Cabras, Vitali, Sanna, & Messana, 2011)

Outra desvantagem está relacionada com o proteoma salivar se encontrar nas variações fisiológicas e nos estímulos que podem modificar significativamente as suas características.

Hoje, a análise proteómica tornou-se num pilar importante nas áreas de diagnóstico da doença e na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos,

desempenhando, ao mesmo tempo, um papel fundamental no domínio da detecção e descoberta de biomarcadores. (Humphery-Smith, 2015)

São vários os estudos que existem para uma melhor compreensão do proteoma salivar.

Em 1996, Veerman et al. identificaram quatro famílias importantes de péptidos salivares: as proteínas ricas em prolina (PPRs), as staterinas, as cistatinas e histatinas; assim como os locais onde eram produzidas. Mais tarde, Messana et al. (2008) e Scarano et al. (2010) vieram confirmar que estas quatro famílias faziam parte dos constituintes principais do proteoma salivar. (Messana et al., 2008) (Scarano et al., 2010) (Veerman, E.C.I, Keybus, P. A. M., Amerongen, 1996)

Como dito anteriormente, as diferentes proteínas são segregadas pelas várias glândulas salivares. As glândulas parótida e von Ebner segregam um fluido seroso, rico em fosfoproteínas, em amilase e em proteínas ricas em prolina; as glândulas sublingual e submandibular produzem fluidos seromucosos; enquanto que as glândulas Blandin-Nuhm segregam um fluido mucoso, rico em mucinas. (Chiappin, Antonelli, Gatti, & De Palo, 2007)

As proteínas mais abundantes na saliva, bem como as suas percentagens, a origem, a glândula secretória e as suas funções, estão representadas nas tabelas 2, 3, 4 e 5 e a figura 4.

Tabela 2: Principais proteínas presentes na saliva, as percentagens, a origem, as glândulas secretórias e a suas funções – Parte I (adaptado de Pfaffe et al. 2011)

Proteína	% na saliva	Origem	Glândula(s) secretória(s)	Função
PRPs	37	Plasma	Parótida e Submandibular	<ul style="list-style-type: none">• Homeostase mineral• Neutralização de substâncias tóxicas da dieta• Proteção tecidual contra ataque proteolítico por microrganismos

Tabela 3: Principais proteínas presentes na saliva, as percentagens, a origem, as glândulas secretórias e a suas funções – Parte II (adaptado de Pfaffe et al. 2011)

Proteína	% na saliva	Origem	Glândula(s) secretória(s)	Função
α - Amilase	20	Pâncreas Glândulas salivares	Parótida e Submandibular	<ul style="list-style-type: none"> • Digestão de amido • Antibacteriana • Lubrificação a cavidade oral
Mucinas	20	Glândulas mucosas	Glândula parótida	<ul style="list-style-type: none"> • Proteção tecidual contra ataque proteolítico por microrganismos • Citoprotetor • Lubrifica a cavidade oral • Proteção contra a desidratação • Manutenção da viscoelasticidade das secreções
Cistatinas	8	Glândula submandibular > Glândula sublingual	Glândulas parótida, submandibular e sublingual	<ul style="list-style-type: none"> • Antibacteriana • Antiviral • Regula o metabolismo das proteínas • Auxilia na proteção dos tecidos no ataque proteolítico por microrganismos • Auxilia na mineralização
Albumina	6	Plasma	Glândulas parótida, submandibular e sublingual	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína transportadora • Proteína de fase aguda negativa • Tampão

Tabela 4: Principais proteínas presentes na saliva, as percentagens, a origem, as glândulas secretórias e a suas funções – Parte III (adaptado de Pfaffe et al. 2011)

Proteína	% na saliva	Origem	Glândula(s) secretória(s)	Função
Staterina	1	-	Glândula parótida	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe o crescimento de hidroxiapatite • Proteção tecidual contra ataque proteolítico por microrganismos • Citoprotetor • Lubrificante Manutenção da viscoelasticidade das secreções
Histatinas	1	Plasma	Glândulas parótida, submandibular e sublinguais	<ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiana e Antifúngica • Mineralização • Inibição da libertação de histamina a partir dos mastócitos – papel na regulação da inflamação oral
IgA solúvel	3	Linfócitos B	Glândulas parótida e submandibular	<ul style="list-style-type: none"> • Imunitária
IgG	2	-	Glândulas parótida e submandibular	<ul style="list-style-type: none"> • Imunitária secundária • Proteção contra vários microrganismos ligando-se a eles

Tabela 5: Principais proteínas presentes na saliva, as percentagens, a origem, as glândulas secretórias e a suas funções – Parte IIV (adaptado de Pfaffe et al. 2011)

Proteína	% na saliva	Origem	Glândula(s) secretória(s)	Função
Lactoferrina	<1	Mucoso > Seroso	-	• Antimicrobiana
Lisozima	<1	Glândula sublingual > Glândula submandibular, plasma	-	• Antimicrobiana

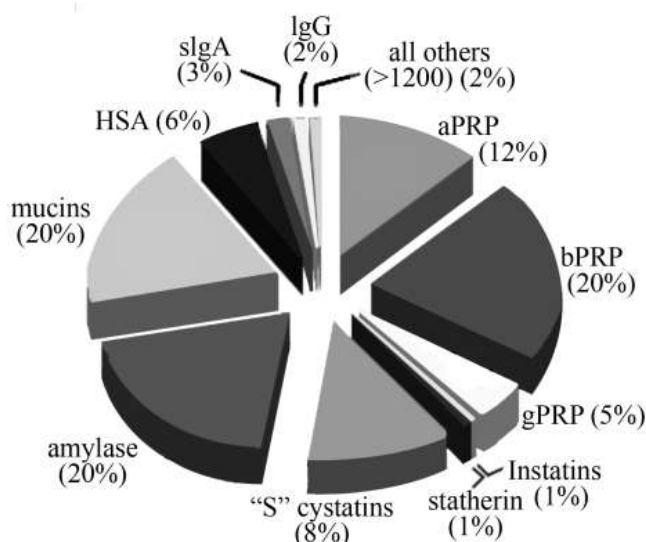


Figura 4: Proteoma Salivar Humano Saudável (Pfaffe et al., 2011)

A identificação das proteínas presentes na saliva humana; a definição do complexo proteico em indivíduos saudáveis; a contribuição das diferentes glândulas salivares; as alterações relacionadas com determinadas patologias, quer sistémicas quer da cavidade oral, são importantes para tornar este fluido biológico uma boa ferramenta de diagnóstico e monitorização. Alguns estudos das proteínas e dos componentes salivares, já permitiram identificar variações entre os estados de saúde normais e de doença. Contudo, só após uma completa caracterização do proteoma salivar humano saudável, será possível a sua comparação com o proteoma de indivíduos com determinada patologia, podendo assim diagnosticá-la ou monitorizá-la. (Amado, Ferreira, & Vitorino, 2013)

3. A passagem de Biomoléculas do Sangue para a Saliva

Como já referido, 30% das proteínas presentes na saliva estão presentes no sangue. Este facto tem um grande interesse, uma vez que a proteómica salivar tem como objetivo tornar-se numa ferramenta de diagnóstico precoce e de monitorização da doença e da terapêutica. Esta tomada de posição é importante, uma vez que este método apresenta algumas vantagens em relação à análise de sangue, como poderá ser visto no capítulo três. (Perez-Cornejo et al., 2012)

As glândulas salivares são órgãos muito vascularizados o que permite que haja trocas de biomoléculas constituintes do sangue. Assim, as alterações provocadas na composição molecular do sangue podem, posteriormente, alterar a composição da saliva.

Neste sentido, é importante perceber os mecanismos de passagem das proteínas do sangue para a saliva, uma vez que é este último fluido biológico que irá ser analisado. As biomoléculas podem entrar na saliva por diferentes vias: *gap junction* (como por exemplo, a passagem de água, iões e hormonas), difusão passiva (maioritariamente, hormonas esteróides), transporte ativo e ultrafiltração, como apresenta a figura 5. (Pfaffe et al., 2011)

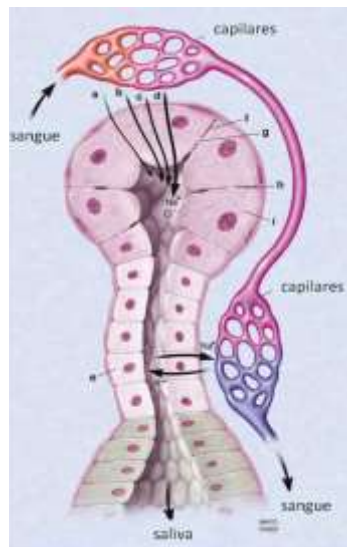


Figura 5: Mecanismos de transporte de biomoléculas do soro para os ductos das glândulas salivares. ¹

¹ a) transporte ativo; b) difusão passiva de lipossolúveis; c) filtração simples; d) transporte ativo de sódio através de célula acinar; e) transporte ativo de Na⁺ através de células do ducto; f) membrana celular; g) poro da membrana celular; h) espaço intercelular; i) célula acinar. (Adaptado de Wong, 2006)

CAPÍTULO III – A Saliva e a Análise Proteômica

1. A Saliva como Meio de Diagnóstico e de Monitorização

Inicialmente, os diagnósticos de doenças sistêmicas eram realizados através de um relato dos sintomas do doente perante um médico ou de outro profissional de saúde, e por fim realizavam-se as análises ao sangue ou urina para avaliarem qualitativamente e/ou quantitativamente alguns marcadores importantes como os iões, anticorpos, níveis hormonais e alguns biomarcadores específicos de determinada doença. Atualmente, os diagnósticos salivares evoluíram para uma ciência sofisticada e a saliva é reconhecida como um bom meio para diagnóstico e monitorização, tanto da doença como da terapêutica, assim como noutras áreas: na descoberta de fármacos, na genética, na nanobiotecnologia, nos alvos biomoleculares e nos biochips. (Rodriguez-Chavez & R., 2012)

A saliva utilizada na sua análise é a saliva total. Esta é um fluido biológico que pode ser recolhido diretamente da boca, tendo sido produzido pelas glândulas salivares: pelas maiores, como a parótida, a sublingual e a submandibular; e pelas menores, como a Von Ebner e a Blandin-Nuhm. As bactérias, os fungos, os vírus, as secreções nasais e brônquicas e o refluxo gastrointestinal, também fazem parte da composição da saliva total. (Chiappin et al., 2007) Esta é facilmente recolhida, de forma não invasiva, ou seja, não é dolorosa, o que diminui o desconforto associado à colheita. Para além de não haver risco de infeção associado, como há no caso da punção venosa para colheita de sangue. Permite também a colheita em qualquer doente, seja ele pediátrico, adulto ou geriátrico, assim como não necessita de equipamento nem pessoal especializado para fazer a sua colheita. (Pfaffe et al., 2011) (Rodriguez-Chavez & R., 2012) (Wong, Shen Hu, Joseph A. Loo, 2010)

Sabe-se que a maioria dos biomarcadores presentes no sangue e na urina estão também presentes numa amostra de saliva. (Rodriguez-Chavez & R., 2012) São estas as proteínas com relevância clínica presentes na saliva que permitem que esta seja como um “espelho do corpo” do doente e permitem o diagnóstico e monitorização de doenças. (Majid Suhail, 2014) Estas proteínas são denominadas de Biomarcadores e serão abordadas mais à frente. (A. Zhang et al., 2013)

São vários os fatores que podem influenciar os dados obtidos a partir da saliva. O sexo, a idade, a alimentação, a variabilidade individual, a estabilidade da amostra e o ritmo circadiano são fatores que devem ser tidos em conta quando se faz a análise. Para minimizar alguns destes fatores é recomendado que a recolha seja efetuada no dia da análise e pelo menos duas horas após uma refeição, diminuindo assim o efeito do ritmo circadiano (período de 24 horas influenciado pelas variações de luz e de temperatura onde ocorrem mudanças físicas, mentais e comportamentais) e da alimentação. (Sciences, 2012) (Amado et al., 2013)

Contudo, existem alguns obstáculos quanto à utilização da saliva nesta área. Alguns dos analitos com informação importante para o diagnóstico encontram-se em pequena quantidade na saliva em relação ao soro. (A. Zhang et al., 2013)

Para que este fluido biológico seja utilizado como meio de diagnóstico é necessário que existam biomarcadores específicos associados ao estado da doença, tecnologias que discriminem esses biomarcadores e métodos de colheita não invasivos para monitorizar e detetar os mesmos. (M Castagnola et al., 2011)

A figura 6 resume as principais vantagens e desvantagens da amostra salivar em relação ao sangue.

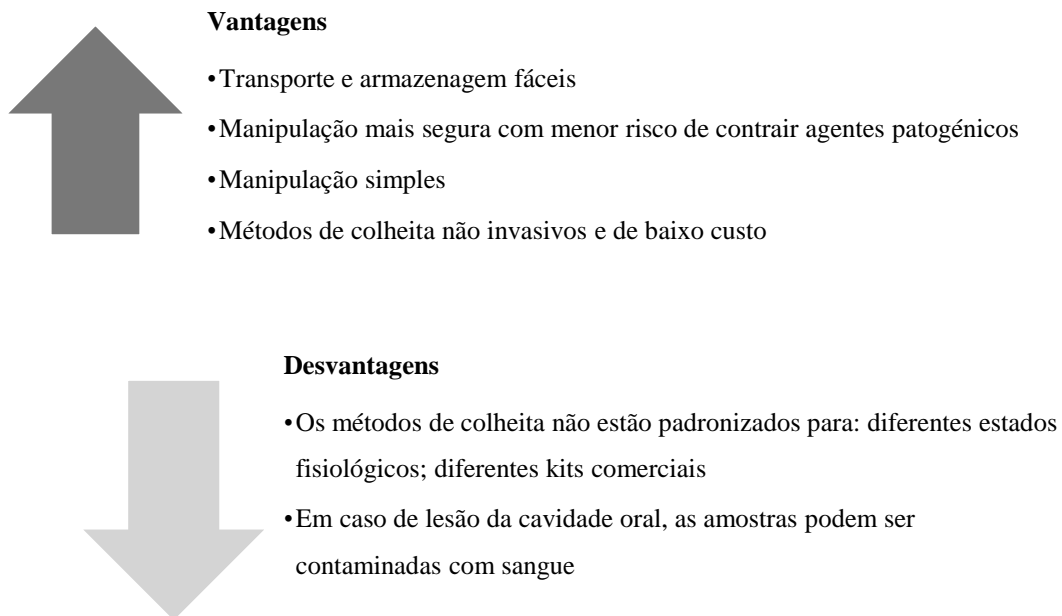


Figura 6: Vantagens e desvantagens da saliva como meio de diagnóstico em relação ao soro. Adaptado de Rahim et al. 2015

Deste modo a saliva começa a ser vista como um potencial fluido biológico para avaliar o estado de doença do doente. (A. Zhang, Sun, & Wang, 2012) (Zauber, Mosler, Heßberg, & Schulze, 2012)

São cada vez mais os estudos que mostram que a saliva tem potencial nesta área do diagnóstico de doenças como infecções virais sistêmicas, doenças neoplásicas, doenças autoimunes, doenças bacterianas, doenças cardiovasculares, doenças metabólicas. (Chiappin et al., 2007) (Giusti et al., 2010) (Xiao et al., 2012) (Wu, Wang, & Zhang, 2009) (Bencharit et al., 2014)

Neste sentido, o interesse por este fluido biológico como meio de diagnóstico e monitorização, assim como pela análise proteômica da saliva como ferramenta para este objetivo tem vindo a aumentar a nível mundial.

2. A Análise Proteômica como Ferramenta de Diagnóstico e de Monitorização

Segundo Chandramouli & Qian (2009), a proteômica é o estudo em larga escala da estrutura e função das proteínas presentes numa amostra biológica complexa. (Chandramouli & Qian, 2009). Atualmente, esta ferramenta é utilizada para o diagnóstico de algumas doenças, através de diferentes tecidos e fluidos corporais tais como a saliva, o fluido lacrimal e o sangue. (Barbosa et al., 2012) A proteômica tem revelado ser uma metodologia preponderante, uma vez que esta revela informações importantes acerca do estado de saúde do organismo em geral, assim como é importante na área da pesquisa e desenvolvimento de fármacos.

Enquanto a genómica, termo utilizado desde 1986, inclui o genoma completo da célula, a proteômica, conhecida em 1997, utiliza os produtos dos genes inteiros de uma célula num determinado estado que abrange as suas atividades celulares e a interação com outras macromoléculas. (Humphery-Smith, 2004) Desta forma, a proteômica permite a análise das proteínas quanto a sua qualidade e quantidade. A análise proteômica revela ser mais vantajosa em relação à genómica uma vez que permite um melhor conhecimento do organismo. (Gupta et al., 2015)

Para uma correta análise do proteoma é importante a extração correta das proteínas e esta varia consoante o tipo e origem da amostra biológica. Segundo Barbosa, et al (2012) a maioria das amostras biológicas devem ser solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e submetidas a tratamento com agente redutores de pontes dissulfito.

A análise proteômica pode ser feita por metodologias diferentes como demonstra a figura 7.

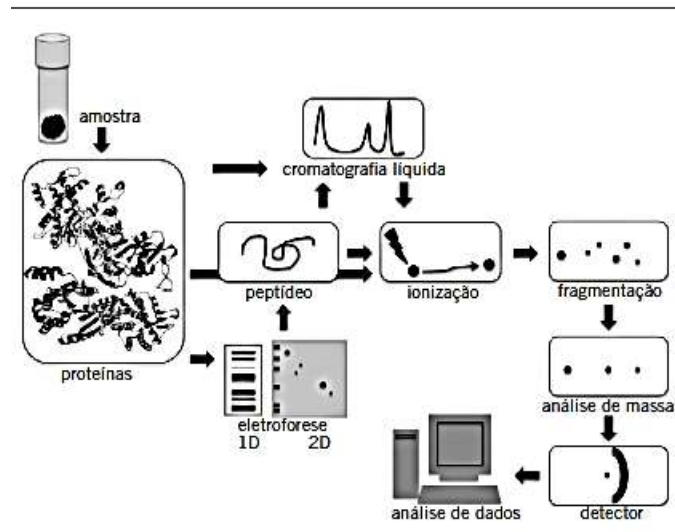


Figura 7: Metodologias diferentes que podem ser combinadas na Análise Proteômica (Barbosa et al., 2012)

Grande parte das técnicas proteômicas têm como base a identificação de biomarcadores, mas cingem-se a aplicações médicas diretas. Outras podem ser utilizadas em prática clínica de rotina para diagnósticos e tem por base as alterações no proteoma, através da análise de diferentes tecidos e fluidos corporais como amostras biológicas. (Barbosa et al., 2012)

Segundo Armorotti (2010), as metodologias podem ser classificadas em dois tipos: *Bottom-up* ou *shotgun* e *top-down*.

Na *Bottom-up* ou *shotgun* recorre-se à cromatografia líquida para separar os péptidos de uma solução complexa e, posteriormente, realiza-se a espectrometria de massa (MS) para análise dos mesmos. É uma metodologia vantajosa no que se refere a sensibilidade e reprodutibilidade, contudo alguns péptidos perdem-se durante a cromatografia e noutros não é possível reconhecer as alterações pós-transducionais.

No caso da metodologia *top-down* recorre-se à MS para análise das proteínas na sua forma complexa, sendo esta uma vantagem em relação à metodologia anterior, na medida em que não são analisados os fragmentos e não há perdas de péptidos, obtendo-se, assim, uma análise mais completa dos constituintes proteicos. (Armirotti & Damonte, 2010)

Outra metodologia utilizada para a separação de proteínas é através de eletroforese uni (1-DE) e bidimensional (2-DE). A eletroforese bidimensional envolve a separação de proteínas em duas etapas seguidas. Na primeira, a focalização isoeétrica, há migração das moléculas em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado ou gerado por tampões anfotéricos até atingirem um ponto no qual a sua carga é igual a zero. Na segunda, as proteínas são separadas de acordo com a sua massa molecular através uma eletroforese com direção perpendicular à primeira em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Esta segunda etapa é idêntica à eletroforese 1-D em que as proteínas são separadas de acordo com a massa molecular através de uma corrida em gel SDS-PAGE. (Barbosa et al., 2012)

Esta metodologia, utilizando a eletroforese, permite obter muitas informações importantes, contudo ainda apresenta algumas limitações, tais como: a utilização de alguns fluidos corporais com proteínas em concentrações abundantes dificulta a migração destas por eletroforese, por outro lado para as proteínas serem analisadas por *top-down* é necessário que estas estejam intactas o que é difícil uma vez que têm de ser extraídas do gel. (Armirotti and Damonte, 2010)

Existem ainda outras abordagens, como o caso dos vários tipos de cromatografias, que permitem melhorar a separação das proteínas e dos péptidos. Numa das metodologias aplicadas há dissolução do analito numa fase líquida com a qual não tem qualquer interação química e este percorre uma fase estacionária, denominando-se esta por cromatografia líquida (LC). (May et al., 2011)

Após a separação das proteínas e dos péptidos caracterizadores do proteoma salivar é necessário a sua identificação e esta pode ser realizada por espectrometria de MS. (Han, Aslanian, & Yates, 2008)

A MS utiliza um aparelho denominado espectrómetro e permite a identificação e quantificação de proteínas. Esta metodologia é muito utilizada em proteômica e permite avaliar essencialmente o rácio massa/carga (m/z) de iões em fase gasosa. (Wilhelm et al., 2014) A ionização por eletrospray (ESI – Electrospray Ionization) e a dessorção/ionização com laser assistido por matriz (MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) são duas técnicas que permitem a ionização de péptidos e proteínas de forma a, posteriormente, poderem ser utilizadas em MS. (Han et al., 2008)(Barbosa et al., 2012)

A primeira (ESI) é utilizada em amostras no estado líquido, já a MALDI é utilizada em amostras no estado sólido. Existem duas variantes à metodologia MALDI: numa das variantes há melhoria da superfície por dessorção/ionização com laser (SELDI

– Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) e é utilizada para analisar proteomas de baixo peso molecular; a outra variante permite a obtenção das massas de péptidos e proteínas a partir de amostras de seções de tecidos biológicos e é denominada de espectrometria de massa de imagem (IMS – Imaging Mass Spectrometry). Esta última apresenta algumas vantagens como é o caso da rapidez e a independência do uso de anticorpos (Gustafsson, Oehler, Ruszkiewicz, McColl, & Hoffmann, 2011)

A pesquisa nesta área da análise proteômica deve continuar a ser desenvolvida, de forma a melhorar as tecnologias utilizadas nesta área, aumentando a sua especificidade e sensibilidade para a identificação de proteínas que se encontrem relacionadas com estados de doença humana específica, com o objetivo final de diagnosticar e monitorizar uma doença com precisão. (A. Zhang et al., 2013)

3. Biomarcadores Salivares

Sabe-se que as várias moléculas constituintes da saliva contêm informações valiosas, assim sendo uma análise quantitativa e qualitativa global das proteínas é essencial. Nos últimos anos, tem existido uma maior pesquisa relativamente à descoberta de proteínas com importância clínica, para o diagnóstico e monitorização de doenças, utilizando para análise as técnicas mencionadas anteriormente. (Strimbu & Tavel, 2011)

De forma a conseguir um bom nível de confiança e fiabilidade, é necessário recorrer a várias análises repetidas da amostra, atingindo assim um coeficiente de variação no intervalo de 20-30%. Para reproduzir o intervalo do coeficiente de variação foi introduzido o método de eletroforese diferencial (2-D DIGE) que permite, a partir de uma única amostra, separá-la em duas ou três amostras e fazê-las correr num único gel, levando a uma melhor comparação entre os perfis de proteomas, aumentando assim a sua precisão. (C. F. Streckfus, Arreola, Edwards, & Bigler, 2012)

São muitos os investigadores que têm vindo a estudar o uso de biomarcadores, uma vez que estes apresentam uma capacidade de diagnóstico da doença e monitorização da progressão da mesma e, até mesmo a resposta a uma determinada terapêutica. Apesar de existirem muitas definições para o termo biomarcador, ainda não existe nenhuma que abranja todos os aspetos das aplicações dos mesmos. Assim, uma das definições propostas é: “alterações celulares, bioquímicas, moléculares, genéticas ou simplesmente processo normal biológico que pode ser reconhecido ou monitorizado”. (Baum, Yates, Srivastava,

Wong, & Melvin, 2011) Um biomarcador é então uma substância utilizada como um indicador de um estado biológico ou para diagnósticos. É uma ferramenta de diagnóstico capaz de fornecer informações importantes para o diagnóstico diferencial, localização da doença e até mesmo conhecer o grau de severidade da infecção/patologia. (Malathi, Mythili, & Vasanthi, 2014)

Tem sido um grande desafio determinar biomarcadores para rastreamento, diagnóstico e monitorização de uma doença ou até mesmo, na determinação da eficácia da terapêutica. (Malathi et al., 2014)

A análise do biomarcador depende de vários fatores como a própria natureza deste, a amostra a partir do qual foi extraído e o mecanismo pelo qual o biomarcador entra na cavidade oral. (Rodriguez-Chavez & R., 2012)

Qualquer espécie molecular que demonstra variação significativa na concentração, comparativamente com os de indivíduos controle, é um biomarcador potencial. (Rahim, Rahim, Ahmad, & Hashim, 2015)

CAPÍTULO IV – Os Biomarcadores Salivares e as Doenças

São vários os estudos que têm sido publicados recentemente, no âmbito da identificação de biomarcadores para o diagnóstico e monitorização de diferentes doenças através da análise proteômica da saliva (Figura 8). (Malathi et al., 2014)

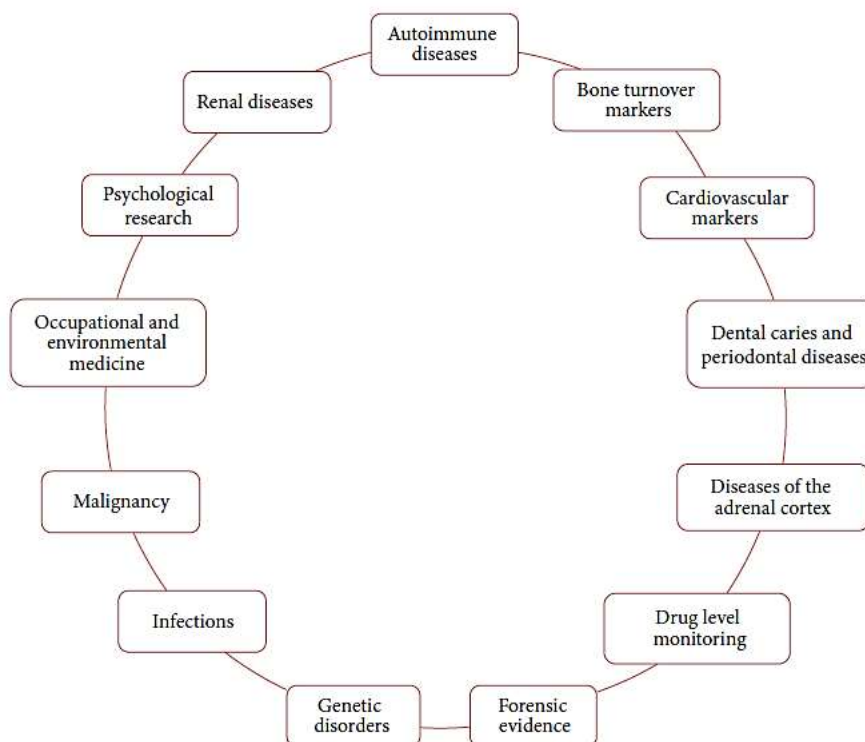


Figura 8: Áreas que utilizam a análise proteômica salivar (Malathi, Mythili, and Vasanthi 2014)

Atualmente, a saliva é utilizada como meio de diagnóstico para doenças sistêmicas e, que estejam relacionadas com a cavidade oral e com as glândulas salivares. No caso do cancro oral, Li, et al (2006) demonstrou que este método é mais preciso do que o diagnóstico através do soro; na síndrome de *Sjögren*; e em infeções virais e bacterianas. (Ambatipudi et al., 2013) (Chiappin et al., 2007) (Y. Li, 2006) Há alguns anos que a saliva é também utilizada a nível forense: através da análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) presente nas células orais, na deteção de substâncias de abuso no organismo e na monitorização de fármacos, de forma a dosear corretamente a sua administração. (Guo, Oswald, Mendu, & Soldin, 2007) (Shirtcliff & Marrocco, 2003) (Ng, Koh, Choo, & Chia, 2006)

As doenças com maior impacto global são as doenças metabólicas, as oncológicas, as neurológicas, e as cardiovasculares, como já foi referido. Existe, assim, uma necessidade aumentada, nestas doenças, de melhorar os métodos de diagnóstico e monitorização, devido ao seu grande impacto.

1. Diabetes Mellitus

A Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica crónica. Ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não consegue usar eficazmente a insulina que produz. Assim, a DM é caracterizada por uma hiperglicemia crónica, ou seja, níveis de açúcar no sangue aumentados, resultado de distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, dos lípidos e das proteínas. Se não for controlada, a doença leva, a longo prazo, a danos, a disfunções ou até mesmo falência de alguns órgãos. (Association American Diabetes, 2015)

Quando a doença não é controlada eficazmente leva a hiperglicemia causando diversos sintomas, como demonstrado na figura 9.

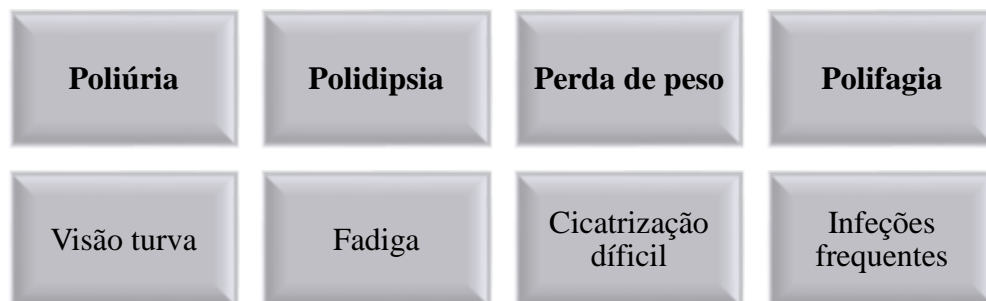


Figura 9: Sintomas de Hiperglicemia. Adaptado de (Association American Diabetes, 2015)

A grande maioria dos casos podem ser classificados em duas categorias: Diabetes Mellitus tipo I e Diabetes Mellitus tipo II.

A DM tipo I é responsável por apenas 5-10% dos casos de diabetes. Resulta da destruição celular autoimune das células β do pâncreas, levando a uma produção deficiente de insulina. Neste tipo de DM há necessidade de administração diária da mesma.

A DM tipo II tem maior prevalência, cerca de 90-95% dos casos de diabetes, do que DM tipo I. Esta resulta da combinação da resistência à insulina e de uma resposta inadequada da secreção da mesma. Neste tipo de DM o grau de hiperglicemia pode não causar sintomas clínicos durante muito tempo, contudo causa alterações patológicas e funcionais em vários tecidos-alvo. Neste período assintomático, é possível detetar esta doença através de uma medição de glucose no plasma em jejum. (Association American Diabetes, 2015)

Foi estimado, em 2002, que em cerca de 171 milhões de pessoas no mundo é diagnosticada esta doença e estima-se que, em 2030 este número passará para 366 milhões. (Hogan, Dall, & Nikolov, 2003) Foram ainda estimadas em 2012, cerca de 1,5 milhões de mortes são relacionadas diretamente com a diabetes. Em 2014, a prevalência global desta doença foi avaliada em 9% em adultos (>18 anos). (Association American Diabetes, 2015)

1.1. Diabetes Mellitus e a Análise Proteómica

Os estudos relativamente à pesquisa e identificação de biomarcadores para detetar de forma não invasiva a pré-diabetes e a diabetes irão facilitar as intervenções destinadas à prevenção ou a retardar a progressão da doença e as suas complicações associadas.

Um estudo publicado por Rao et al. (2009) teve dois objetivos principais: a caracterização do proteoma salivar em doentes com diabetes tipo II; a identificação de potenciais biomarcadores característicos desta doença.

Foi realizada uma análise por cromatografia líquida multidimensional, assim como, uma espetrometria de massa (2D-LC-MS/MS). Na caracterização do proteoma salivar identificaram-se 487 proteínas: 67% já tinha sido identificadas noutros estudos; 33% ainda não tinham sido encontradas até à data; e cerca de 13,5% destas proteínas apresentavam-se muito diminuídas no proteoma de diabéticos em relação ao proteoma indivíduos saudáveis. (Rao et al., 2009)

A figura 10 representa o proteoma salivar de doentes com DM tipo II. A tabela 1, apresentada anteriormente refere as funções em percentagem das proteínas salivares, sendo possível, desta forma, comparar as diferenças entre indivíduos normais e indivíduos saudáveis.

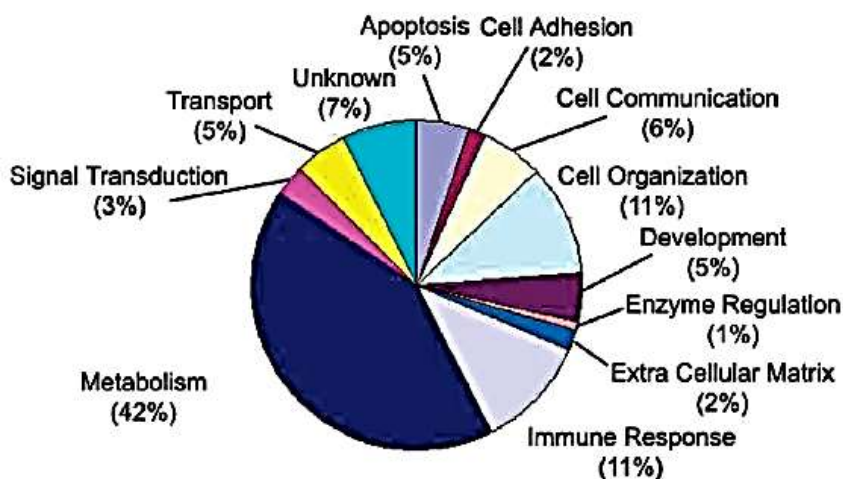


Figura 10: Proteoma Salivar de doentes com Diabetes Mellitus Tipo II (Rao et al. 2009)

As proteínas salivares que exibiam uma expressão diferente da saliva dos controlos tinham função metabólica, funções no desenvolvimento, na organização celular, na resposta imunitária, na comunicação celular, na proliferação e na morte programada. A sobreexpressão de algumas proteínas do sistema imunitário, como é o caso da Cistatina C, do inibidor da elastase de leucócitos (LEI) e da uteroglobina (UTER), já era algo esperado, uma vez que, existem estudos anteriores que relacionam o sistema imunitário com a doença diabetes (Tabela 5). (Pickup & Crook, 1998) (Fernández-Real & Pickup, 2008)

A tabela 6 apresenta a função detalhada de cada uma das proteínas do sistema imunitário referidas anteriormente.

Tabela 6: Funções das Proteínas Cistatina C, LEI e UTER. (Adaptado de Rao et al., 2009)

Cistatina C	Potente inibidor das proteínas de cisteína lisossómica	No soro – utilizada como marcador da filtração glomerular Elevada em doença cardiovascular e em DM
LEI	Regulador da atividade das proteases dos neutrófilos,	No plasma – PMN-E é utilizada como marcador de hipertensão e de

	incluído a elastase polimorfonuclear (PMN-E)	doenças micro e macrovasculares em DM tipo II
UTER		É indicador da função renal tubular na DM

Outras das proteínas elevadas na saliva de diabéticos foram a α -1-tripsina (A1AT), a α -2-macroglobulina (A2MG) e a proteína de ligação ao retinol 4 (RBP4). Num outro estudo realizado por Rao et al. (2007) encontrava-se aumentada a proteína A1AT na urina de doentes com diabetes, confirmando assim que esta poderia ser um bom biomarcador. (Rao et al., 2007)

Um estudo anterior relatava também variações na A2MG em diabéticos. Estas variações eram relacionadas com a diabetes quando existia desequilíbrio do sistema protéase-antiprotease, podendo os doentes diabéticos aumentarem o risco de desenvolver complicações cardiovasculares. (Lisowska-Myjak, Pachecka, Kaczyńska, Miskurka, & Kadziela, 2006) Um aumento significativo desta proteína na saliva será um fator a ter em conta na avaliação da diabetes, podendo este ser considerado um bom biomarcador.

A RBP4 do plasma já era utilizada como biomarcador de distúrbios metabólicos iniciais associados a DM. (Cabré et al., 2007) Assim, este estudo propõe também a utilização da RBP4 salivar como biomarcador de DM.

A apolipoproteína (apo) B100 é uma das formas principais de apo B. Estudos relatam que em indivíduos diabéticos são conhecidos níveis elevados de apo B-100, uma vez que existe aumento da produção e redução das taxas de fração. (Hogue et al., 2007)

A anidrase carbónica 1 revelou estar presente em baixos níveis na saliva de DM, o que também já tinha sido visto nos eritrócitos de doentes com DM. (Gambhir, Ornasir, Headings, & Bonar, 2007) Assim como a proteína lamina A/C que também revelou baixa expressão. Esta é uma proteína característica da diabetes. Mutações no gene LMNA levam à perda de tecido adiposo subcutâneo, à resistência à insulínica, a dislipidemias e a diabetes tipo II. (Hegele, 2007)

Mais tarde, em 2010, Tiziana Cabras et al, centraram-se na pesquisa da composição da fração solúvel ácida da saliva total por RP-HPLC-ESI-MS num grupo de crianças e adolescentes com DM tipo I e num grupo controlo. Os resultados deste estudo demonstraram: uma diminuição da concentração de staterina, péptido P-B rico em

prolina, péptido P-C, histatina-1 (Hst-1); e um aumento da concentração de α -defensinas 1,2 e 4, de S100A9 e de vários péptidos pequenos. (T. Cabras et al., 2010)

Para melhor compreensão dos péptidos recorreu-se a uma análise *Tandem-MS* e observaram-se fragmentos peptídicos P-C, que foram confirmados por diminuição da concentração do péptido intacto. Segundo Helmerhorst et al. (2008) esta fragmentação observada pode estar relacionada com uma protease glutamínica com provável origem microbiana. (Helmerhorst, Sun, Salih, & Oppenheim, 2008) Este estudo veio sugerir que havia maior atividade desta enzima na cavidade oral de doentes diabéticos.

A concentração de staterina em diabéticos diminuiu em comparação com indivíduos saudáveis, assim como a concentração do péptido P-B. Este resultado é curioso, uma vez que ambas são secretadas pelas glândulas parótida e submandibular/sublingual. Segundo Inzitari et al. (2006) há uma correlação muito significativa entre as duas proteínas e este estudo apoia também esta conclusão. (Inzitari et al., 2006)

Outra proteína que apresentou uma concentração mais baixa em diabéticos do que em indivíduos saudáveis foi a Hst-1. Esta proteína é essencial no que diz respeito à proteção da cavidade oral devido as suas propriedades curativas. Uma vez que esta apresenta uma concentração abaixo do normal, estes doentes estão mais suscetíveis a lesões na cavidade oral. (Oudhoff et al., 2009)

Neste estudo algumas proteínas da saliva de doentes com DM tipo I tiveram uma expressão aumentada em relação à saliva dos indivíduos saudáveis. O aumento da concentração de α -defensinas em doentes com DM veio de encontro com os resultados já obtidos por Seraheimo et al (2008) e Sthoeger Z. M. et al (2008), que tinham demonstrado que a saliva conseguia refletir a concentração plasmática de α -defensina, podendo esta ser utilizada como marcador de risco clínico. (Saraheimo et al., 2008) (Sthoeger, Bezalel, Chapnik, Asher, & Froy, 2009) (Joseph et al., 2008)

O aumento da concentração de S100A9 veio também ao encontro de outros estudos já publicados. Esta proteína, tal como a S100A8 (que não teve aumento da expressão, como seria de esperar), têm um papel importante na inflamação, tendo como funções a quimiotaxia, a inflamação do local, a regulação da adesão, a migração transendotelial de leucócitos e a atividade antimicrobiana. O facto de a S100A9 aumentar a sua expressão e a S100A8 não, é um ponto importante a ser considerando uma vez que, Bouma et al. (2005), num estudo em diabéticos tipo I, também verificaram o mesmo. Estes estudos sugerem que o aumento da expressão da S100A9 pode ser caraterístico deste tipo de diabetes. (Bouma et al., 2005)

Em 2012, Border et al. realizaram um estudo, em doentes desdentados com Diabetes Mellitus tipo II, com o objetivo de explorar a relação entre o proteoma salivar e a condição de diabetes. A partir de uma abordagem proteômica foi possível a identificação de 52 biomarcadores salivares: 14 proteínas secretadas pelas glândulas salivares, 4 proteínas plasmáticas, 6 imunoglobulinas e outras 32 proteínas de origens diferenciadas (proteínas dos tecidos, citoplasmáticas, e proteínas não caracterizadas). Foi também possível a comparação destes resultados com estudos anteriores.

A figura 11 demonstra a comparação dos resultados obtidos neste estudo com outros estudos realizados em indivíduos com DM.

Study (REF: sample)	Our study (saliva)	Li et al. ¹⁵ (serum)	Hittle et al. ¹⁸ (muscle)	Rao et al. ⁸ (saliva)	Hirtz et al. ⁹ (saliva)
GAPDH	U		U		
SAA	U	U			
PIP	U				D
CYTS	U				
CYTN	D				D
CAH 6	D			U	
UTER	D			U	
PLUNC	D			U	
TRFE	D	D			D
AMY1	D				D
A2MG	D			U	

REF: reference number; U: upregulated; D: downregulated; N: no significant change.

Figura 11: Comparação dos resultados obtidos com os resultados de outros estudos realizados em diabéticos (Border et al., 2012)

Duas das proteínas identificadas neste estudo já tinham sido identificadas no soro de doentes com DM tipo II, anteriormente. (R.-X. Li et al., 2008). Uma das proteínas expressa na saliva e no soro de doentes diabéticos é a amiloide A do soro (SAA). Esta foi também relacionada com um mediador inflamatório, a proteína C reativa. Estas duas proteínas associadas a outras moléculas de imunidade inata, são conhecidas por serem sobreexpressas em doentes com DM tipo II. (Pickup & Crook, 1998) Também a serotransferrina (TrFE) foi expressa de igual forma na saliva e no soro de diabéticos. Uma vez que este estudo foi realizado apenas em doentes sem dentes e se verificou um aumento destas proteínas, pode significar que a presença destas proteínas na saliva ocorra por secreção através do aparelho glandular salivar. Estes doentes não têm dentes logo as proteínas não são secretadas pelas fendas gengivais. (Fabian, Fejerdy, & Csermely, 2008)

Outra das proteínas aumentadas na saliva destes doentes foi a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GADPH). Esta proteína já tinha sido verificada com um aumento da sua concentração no músculo de mulheres obesas. Desta forma, Border et al. (2012) sugerem que é possível existir uma relação entre os distúrbios metabólicos e a presença desta proteína na saliva, tornando também a GADPH num potencial biomarcador para esta patologia.

Border et al (2012) comparou o seu estudo com o estudo de Rao et al., (2009), uma vez que utilizava um método de colheita e análise semelhante. Esta comparação foi surpreendente na medida em que as únicas proteínas identificadas em comum foram a anidrase carbónica 6, a UTER, a proteína clonal do epitélio nasal, do palato e dos pulmões (PLUNC) e A2MG, e a expressão destas entre os dois estudos foram completamente opostas. Estes resultados podem dever-se a vários fatores, tais como, amostras diferentes (num dos estudos eram doentes diabéticos desdentados e no outro não; as amostras de ambos os estudos tinham pequenas dimensões; e as amostras eram de populações diferentes). A presença da anidrase carbónica 6 na saliva tem sido relatada por vários estudos em diferentes doenças, podendo concluir assim que esta proteína não pode ser um biomarcador específico para a DM. (C. F. Streckfus et al., 2008) (Rao et al., 2009) (Yu et al., 2010)

Um outro estudo que permitiu a Border et al. (2012) retirar mais conclusões através de uma comparação foi o estudo de Hirtz et al. (2006). Neste estudo apenas interessavam doentes com DM grave, isto é, com níveis de hemoglobina glicosilada ou hemoglobina A1c a mais de 8%, e doentes mal controlados pela insulina. Comparando os estudos, ambos apresentaram as proteínas α -amilase (AMY-1), a cistatina salivar (CYTN), a proteína indutora de prolactina (PIP) e a TrFE com expressão diminuída. Estes resultados podem indicar que as secreções salivares estão prejudicadas parcialmente em indivíduos com DM.

A proteína AMY-1 mostrou que poderá ser um potencial biomarcador para DM, uma vez que em ambos os estudos existiu diminuição da sua expressão. Realizou-se uma análise de validação em *Western blot* que confirmou a redução da AMY-1 em amostras salivares de doentes com DM. (Hirtz, Chevalier, Sommerer, & Raingeard, 2006)

A figura 12 refere então a validação em *Western-blot* da AMY-1 como biomarcador salivar de DM. O ND significa indivíduos não diabéticos, enquanto que o D representa indivíduos com esta patologia.

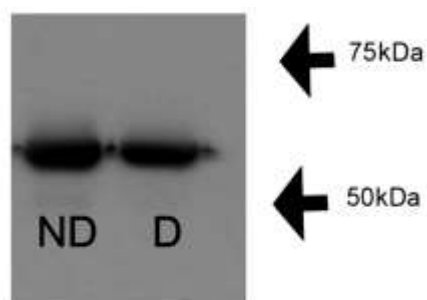


Figura 12: Validação em *Western blot* da AMY-1 como biomarcador salivar de DM (Border et al 2012)

Um estudo mais recente de Bencharit et al. (2014) teve como objetivo investigar as diferenças que existem no proteoma salivar de doente com DM com base nos níveis de hemoglobina A1c, utilizando o método LC/MS/MS. Os resultados demonstraram que existia mudanças significativas ao nível do proteoma salivar dos doentes com DM. Verificaram que existia alterações na hemoglobina A1c e que estas eram mais relevantes em DM tipo I do que em DM tipo II. Estes resultados já eram de esperar, uma vez que os doentes com DM tipo II são normalmente doentes com mais idade e por conseguinte, apresentam mais problemas de saúde.

Foram verificadas mudanças no proteoma salivar ao nível das proteínas séricas, como é o caso da hemoglobina (Hb), da albumina (ALB), da hemopexina (HEMO), da haptoglobina (HPT), da TrFE, da CYTN, do complemento C3 (CO3) e da SAA mas apenas as mudanças na albumina (ALB) e AMY-1 foram validadas por *Western blot*. Foi verificado que estas mudanças do proteoma salivar estão associadas a aumento da hemoglobina A1c. Os resultados obtidos neste estudo vieram também de encontro aos resultados obtidos no estudo, já abordado nesta monografia, de Border et al. (2012). (Bencharit et al., 2014)

A tabela 6 e a tabela 7 apresentam os resultados obtidos nos estudos abordados anteriormente comparando os métodos de análise e os resultados obtidos.

Tabela 7: Resumo dos estudos – Parte I

Estudo	Ano	Método de análise	Resultados
Hirtz et al.	2007	2-DE e MALDI/MS	Diminuição da concentração: <ul style="list-style-type: none"> • Alfa-amilase • Cistatina • PIP
Paturi V. Rao et al.	2008	2D-LC-MS/MS	Aumento da concentração de: <ul style="list-style-type: none"> • Alfa-2-microglobulina • Alfa-1-antitripsina • Cistatina C • Amilase • Transtirretina
Rao et al.	2009	2D-LC-MS/MS	Diminuição: <ul style="list-style-type: none"> • Anidrase Carbónica 1 • Lamina A/C Diminuição: <ul style="list-style-type: none"> • Cistatina C • LEI • UTER • A1AT • A2MG RBP4

Tabela 8: Resumo dos Estudos - Parte II

Estudo	Ano	Método de análise	Resultados
Tiziana Cabras et al.	2010	RP-HPLC-ESI-MS	Diminuição: <ul style="list-style-type: none"> • Staterina, • Péptido P-B rico em prolina • Péptido P-C • Hst-1 Aumento: <ul style="list-style-type: none"> • α-defensinas 1,2 e 4, • S100A9 • Vários péptidos pequenos
Border et al.	2012	2D-LC-MS/MS	Aumento da concentração de: <ul style="list-style-type: none"> • SAA Diminuição da concentração de: <ul style="list-style-type: none"> • TrFE
Bencharit et al.	2014	LC/MS/MS	Alterações na expressão de Hb, ALB, HEMO, HPT, TrFE, CYTN, CO3 e AMY-1

Após a análise dos vários pode-se verificar que as alterações, tanto qualitativas como quantitativas, no proteoma salivar são visíveis em todos. As proteínas salivares têm mostrado ser utilizadas para complementar os métodos atuais de diagnóstico e monitorização, contudo é essencial uma melhor caracterização e validação destes biomarcadores, assim como a pesquisa de novos.

Em suma, a figura 13 demonstra os possíveis potenciais biomarcadores salivares de DM num futuro próximo, tendo em conta os vários estudos abordados anteriormente.

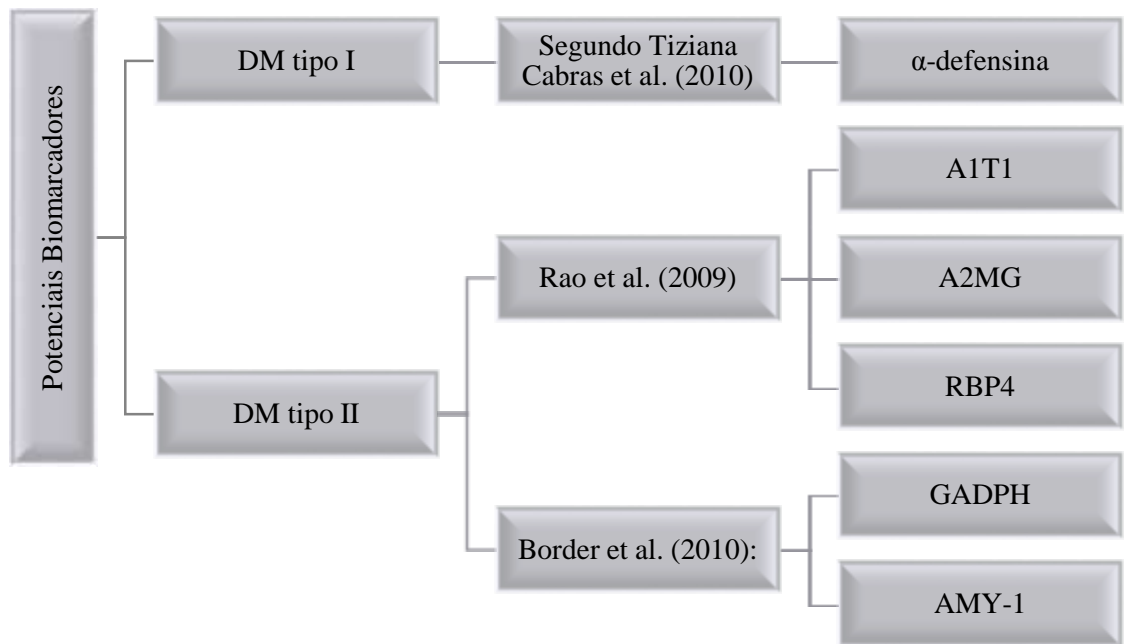


Figura 13: Resumo dos Potenciais Biomarcadores Salivares de DM

Um dos problemas que se coloca nestes doentes com DM é o facto da monitorização desta patologia exigir um método invasivo. No entanto, a análise proteómica da saliva tem mostrado ser uma boa base para novos testes não-invasivos, como a deteção e monitorização da DM.

2. Cancro de mama

O cancro de mama é uma doença que ocorre quando as células mamárias perdem o seu mecanismo de controlo e sofrem alterações no DNA, tornando-se assim células de cancro. Estas células não morrem quando envelhecem ou se danificam, produzem novas células que não são necessárias, de forma descontrolada, resultando na formação de um cancro. (American Cancer Society, 2014)

Esta doença não tem uma causa específica, mas há mulheres com fatores de risco que aumentam a predisposição para o cancro de mama. Estes fatores são essencialmente: a idade (mulheres de > 65 anos), a historia pessoal de cancro de mama, a história familiar, as alterações na mama, as alterações genéticas, a primeira gravidez depois dos 31 anos, uma história menstrual longa, a terapêutica hormonal de substituição, a raça (ocorre mais em mulheres caucasianas), a radioterapia no peito, a densidade da mama, a obesidade

após menopausa, a inatividade física e as bebidas alcoólicas. (Liga Portuguesa Contra o Cancro, n.d.-b)

Este tipo de cancro não-cutâneo é o mais comum entre o sexo feminino e corresponde à segunda causa de morte por cancro neste género. Em Portugal, morrem, anualmente, 1500 mulheres, e são detetados à volta de 6000 novos casos de cancro de mama. (Liga Portuguesa Contra o Cancro, n.d.-a)

Esta é uma das doenças com mais impacto no seio do sexo feminino uma vez que há agressão de um órgão cheio de simbolismo, na maternidade e na feminilidade, assim como por ser uma doença que ocorre com muita frequência.

Atualmente, as formas de diagnóstico disponíveis são: o exame clínico à mama, a mamografia de diagnóstico, a ecografia, a ressonância magnética, a biópsia e posteriormente o médico pode pedir exames adicionais. Há evidências de que a deteção e um diagnóstico precoce desta doença permite uma taxa de sobrevivência que pode chegar até aos 95%. (Liga Portuguesa Contra o Cancro, n.d.-c)

2.1. Cancro de mama e a Análise Proteómica

A deteção precoce do cancro de mama é essencial para aumentar a taxa de sobrevivência uma vez que há uma melhoria na resposta à terapêutica, obtendo assim melhores resultados, mais duradouros, diminuindo o sofrimento e até os custos associados à doença. O desenvolvimento de novos métodos que consigam detetar, de forma eficiente e precisa, indivíduos que possam estar afetados com cancro de mama é o objetivo de vários investigadores há alguns anos. (Etzioni et al., 2003) (Hinestrosa et al., 2007) (Levenson, 2007)

Neste sentido, tem existido um aumento do esforço na pesquisa e desenvolvimento de marcadores para a deteção desta doença num estado precoce. Contudo, exista algumas limitações, principalmente devido há falta de sensibilidade e especificidade para esta situação clínica. (Hudelist et al., 2006)

Como é de conhecimento geral, estamos numa Era de desenvolvimento tecnológico, e esse desenvolvimento é visível na área da saúde. Estes avanços têm permitido novas descobertas, como no caso dos diagnóstico salivares através da análise proteómica. Alguns estudos, mais antigos, demonstraram que os níveis elevados de algumas proteínas indicadoras de cancro de mama podem estar presentes na saliva e ser

analisadas através de técnicas imunológicas. Isto sugeriu que existia ligação entre o tumor da mama e a glândula salivar. (C. Streckfus et al., 2000) (C. Streckfus et al., 2000) (L. Zhang et al., 2010)

C.F. Streckfus et al (2008) realizaram o primeiro estudo em doentes oncológicos, tendo como objetivo determinar os subprodutos secundários expressos na saliva, relacionados com o cancro de mama. Neste estudo procedeu-se a uma análise LC-MS/MS e obtiveram-se os seguintes resultados (Anexo 1 e 2). O diagrama de Venn (figura 14) representa a sobreposição das proteínas encontradas na saliva de mulheres em três situações diferentes: saudáveis, com tumor benigno e com cancro.

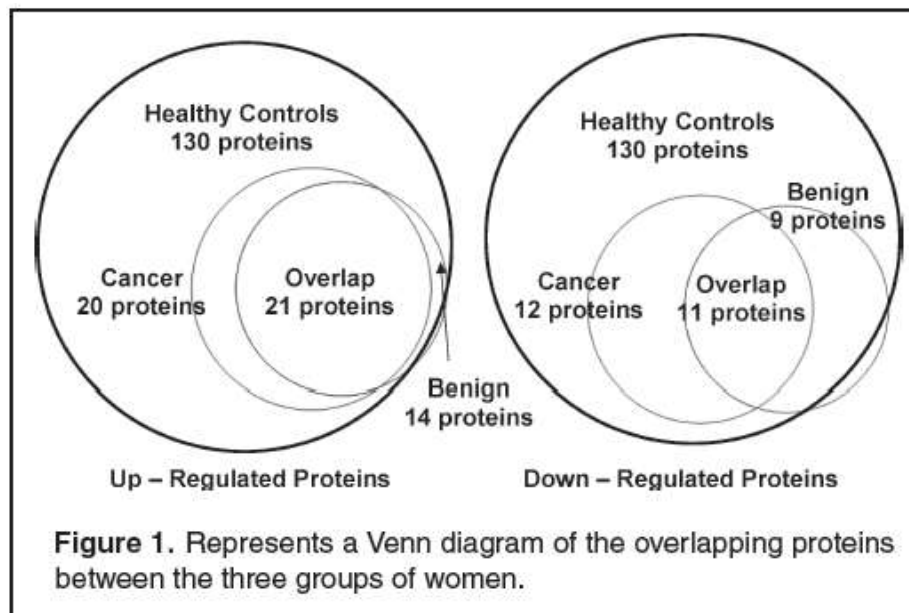


Figura 14: Diagrama de Venn

Neste estudo não se conseguiu perceber qual o mecanismo subjacente a estes resultados, mas sugeriram que havia possibilidade de haver uma via comum para ambas as doenças. Verificaram que muitas das proteínas identificadas no presente estudo, já tinham sido expressas no sangue e em tecidos cancerígenos. (Chambery et al., 2006) (Pucci-Minafra et al., 2006) (Somari et al., 2003)

C.F. Streckfus et al. procederam à comparação entre os proteomas salivares das mulheres com cancro e com tumor benigno da mama, de forma a poder distinguir estas duas situações clínicas. Os resultados desta comparação permitiram observar que apenas setes proteínas permaneciam significativamente diferentes ($p < 0,005$). Contudo, os

autores não conseguiram esclarecer o mecanismo que leva há presença destas proteínas no carcinoma da mama. Colocaram apenas a hipótese de existir uma comunicação extracelular entre os dois tecidos distantes, uma vez que o tecido do ducto da mama e o tecido das glândulas salivares é muito semelhante. (C. F. Streckfus et al., 2008) Existe uma grande necessidade de estudos celulares que permitam esclarecer os mecanismos que levam há expressão destas proteínas na saliva.

Um outro estudo, de L. Zhang et al. (2010), testou a hipótese da existência de biomarcadores de cancro da mama discriminatórios na saliva. Para a concretização deste objetivo foram utilizadas duas tecnologias diferentes: uma para avaliar se os perfis do transcriptoma e do proteoma salivar muda com o aparecimento de cancro da mama; e outra para avaliar se os biomarcadores discriminatórios podem ser identificados e validados.

Neste estudo, oito dos 27 transcritos de mRNA com expressão aumentada foram pré-validados usando um coorte independente, obtendo-se assim uma taxa de validação de 29,6%. Esta taxa foi semelhante à de um estudo anterior para cancro de pâncreas, que obteve 24,5%. O gene CA6 que foi validado neste estudo e também já tinha sido descoberto num estudo, falado anteriormente, de proteomica salivar em doentes com cancro de mama. Este facto sugere o grande potencial deste biomarcador para a deteção precoce de cancro de mama. (L. Zhang et al., 2010)

Surge outro estudo de C.F.Streckfus et al. em 2012, com o objetivo de comparar os perfis das proteínas salivares em doentes com diagnóstico de cancro de mama com o recetor HER-2/neu positivo ou negativo, usando LC-MS/MS. Este estudo aponta também para o apoio do uso da expressão das proteínas na saliva como um método de monitorização do cancro da mama.

Os resultados deste estudo foram de encontro aquilo que era esperado. Uma vez que as glândulas salivares contêm recetores HER-2, é de notar as alterações provocadas no proteoma salivar. (C. F. Streckfus et al., 2012)

Hoje em dia, a proteína HER-2/neu (HER2) também designada por c-erbB-2, já é utilizado como biomarcador em biópsias de tecidos da mama obtidos a partir de mulheres diagnosticadas com cancro da mama. (Hammond, Hayes, & Wolff, 2011) (Wolff et al., 2007)

A tabela 9 apresenta um resumo dos estudos de análise proteómica da saliva de indivíduos com cancro da mama citados acima.

Tabela 9: Resumo dos Estudos

Autores	Ano	Método	Resultados
C.F. Streckfus et al.	2009	SCX-LC-ESI-MS/MS iTraq	Expressão diferencial de 49 proteínas
L. Zhang et al.	2010	2DE (DIGE)-MALDI- MS/MS	Identificação de 8 biomarcadores de mRNA Aumento da concentração de anidrase carbónica 6
C.F. Streckfus et al.	2012	LC-MS/MS	Expressão diferencial de 71 proteínas.

Os estudos sugerem desconhecimento quanto ao mecanismo que relaciona a relação subjacente entre as doenças sistémicas e os biomarcadores salivares. Ainda assim apontam para que existam alterações significativas no proteoma salivar em doentes oncológicos, e que estas possam abrir um novo método de diagnóstico e monitorização desta doença.

Com a investigação contínua nesta área, prova a diferenciação entre os vários os cancros da mama não são todos iguais, tendo cada um deles biologia molecular diferente. Posto isto, verifica-se a necessidade de estudos adicionais para determinar a sensibilidade e especificidades destas proteínas, podendo serem consideradas biomarcadores para cada tipo de cancro de mama.

3. Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF)

A PAF é uma doença neurodegenerativa, associada à deposição de uma substância fibrilar altamente insolúvel, designada por amiloide, em diversos tecidos (mais concretamente, nos nervos). Esta fibra é constituída por subunidade de uma proteína do sangue que transporta hormonas da tiroide e Vitamina A. Esta doença é autossómica dominante, ou seja, se o progenitor for portador heterozigótico a probabilidade de um filho ser também portador da mutação é de 50%. (Associação Portuguesa de Paramiloidose, 2015a)

Em condições normais, a transtirretina (TTR) é uma proteína solúvel que circula no sangue. Todavia, esta proteína pode sofrer determinadas mutações que alteram a sua estrutura, formando fibras de amiloide nos tecidos. A principal forma mutada de TTR encontrada nos doentes PAF, em Portugal, é a TTR Met 30 (substituição do amido ácido, de valina por metionina, na posição 30). (Associação Portuguesa de Paramiloidose, 2015a)

A deposição nos vários tecidos leva a que os sintomas se manifestem em vários órgãos e sistemas. Estes sintomas surgem, em cerca de mais de 80% dos casos, antes dos 40 anos (conceição, 2006) e podem variar consoante o tipo de mutação amiloidogénica. Esta doença é fatal e tem uma evolução média de 10 anos. (Associação Portuguesa de Paramiloidose, 2015a)

A figura 15 demonstra as manifestações clínicas em indivíduos portadores de PAF (Associação Portuguesa de Paramiloidose, 2015b).

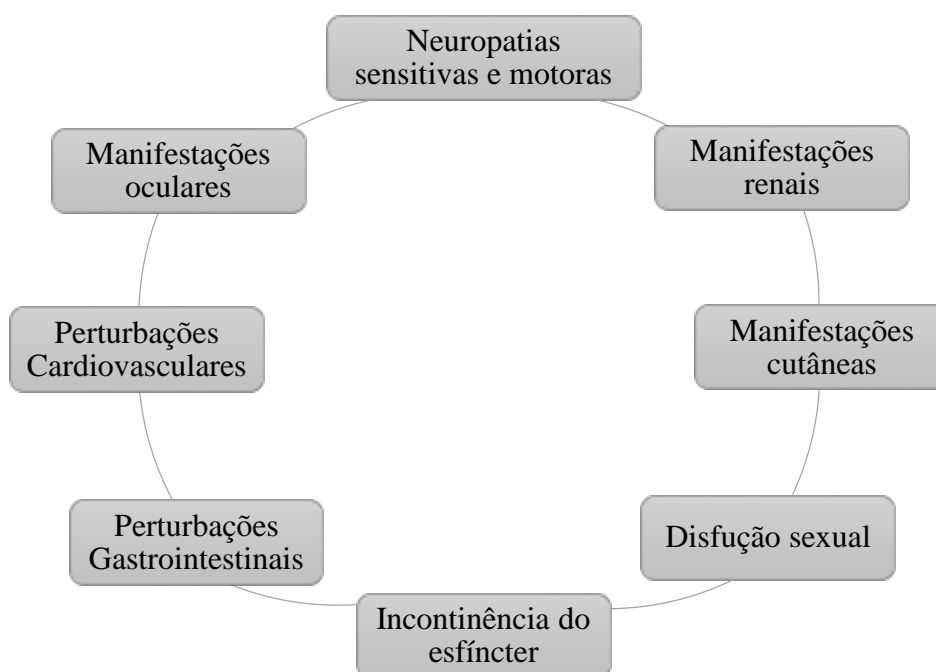


Figura 15: Manifestações clínicas da Polineuropatia Amilóide Familiar

Atualmente, pensa-se que a TTR pode ser a causa de todos os sintomas que surgem na PAF e que posteriormente levam à morte por esta doença. (Guerreiro, 2010)

3.1. Polineuropatia Amiloidótica Familiar e a Análise Proteômica

O diagnóstico da PAF já foi realizado por biopsia às glândulas salivares labiais por estas conterem depósitos de TTR, que se relacionam com a deposição no sistema nervoso periférico. Assim sendo, considerou-se a possível alteração do funcionamento das glândulas salivares, passível de ser refletido na própria saliva. (Guerreiro, 2010)

Um estudo realizado por Guerreiro, em 2010, teve como objetivo principal a pesquisa de biomarcadores na saliva de indivíduos paramoloidóticos. (Guerreiro, 2010)

Após análise proteômica da saliva, observaram alterações ao nível do proteoma salivar dos indivíduos com PAF, tal como era de esperar. (Guerreiro, 2010)

A figura 16 apresenta os resultados do estudo através de métodos, bastante distintos, análises eletroforéticas unidimensionais, experiências de 2D e *Western-blot*.

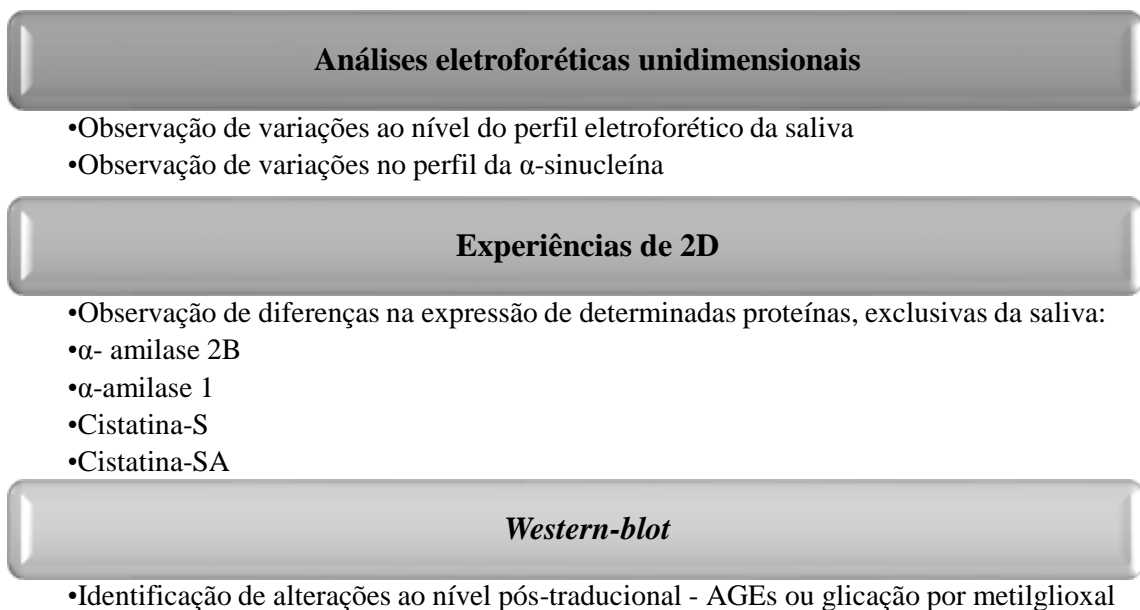


Figura 16: Resultados do estudo Guerreiro, 2010

A presença de alterações na expressão de proteínas exclusivas da saliva e do soro, sugeriu a existência uma contribuição do soro; e a participação ativa das glândulas salivares nesta situação clínica. (Guerreiro, 2010)

A identificação de AGEs ou glicação por metilglioxal, revelou que este processo ocorre num maior número de proteínas na saliva de indivíduos com PAF. A grande parte

das proteínas identificadas como glicadas diferencialmente apresentavam-se expressas diferenciadamente na saliva de indivíduos com PAF. (Guerreiro, 2010)

O soro destes indivíduos apresentava várias proteínas glicadas. Esta situação pode ser consequência das modificações provocadas na proteína, que podem dificultar o processo de filtração do soro para a saliva, devido à insolubilidade causa pela glicação. (Guerreiro, 2010)

Neste estudo concluiu-se que a TTR, proteína associada à PAF, sofre alterações na estabilidade do seu tetrâmetro na saliva, apresentando uma composição maior da sua estrutura monomérica. Estes resultados demonstram estar de acordo com estudos realizados anteriormente através do soro de doentes com PAF, mostrando assim a sua concordância. (Guerreiro, 2010)

Foi possível verificar que para além da α -sinucleína, existem outras proteínas diferenciadamente expressa na saliva de indivíduos PAF. Tendo em conta estes resultados, as proteínas glicadas passam a ser potenciais biomarcadores do desenvolvimento de sintomas de PAF. (Guerreiro, 2010)

CAPÍTULO V – Conclusão

Apesar de nos últimos anos terem sido realizados grandes esforços no domínio da investigação proteómica salivar, é necessário que estes esforços continuem a decorrer, de forma a padronizar o método de colheita da amostra, o procedimento pré-tratamento e a análise proteómica. É importante a continuidade da análise e a identificação do conteúdo do proteoma humano, uma vez que este contribui para o entendimento da fisiopatologia e para o reconhecimento de potenciais biomarcadores de doenças humanas. Assim, promove-se a saliva como fluido de escolha para fins de diagnóstico, prognóstico e monitorização da doença. (Amado et al., 2013) Sendo este fluido possuidor de numerosas proteínas e fragmentos proteicos de valor analítico.

Os desenvolvimentos futuros no domínio dos diagnósticos salivares podem revolucionar a abordagem no rastreio, avaliação de risco e manipulação terapêutica para uma série de condições de saúde. Num futuro próximo, espera-se que os diagnósticos salivares tenham adquirido relevância após o seu aperfeiçoamento de modo a que um painel de biomarcadores de diagnóstico possam ser avaliados e os resultados obtidos num curto espaço de tempo, melhorando assim a qualidade de vida dos doentes. (A. Zhang et al., 2013)

Futuramente, com uma caracterização bem definida do proteoma salivar, com biomarcadores potenciais e precisos para determinadas doenças e com toda a técnica associada a esta metodologia bem caracterizada, a validação e a especificidade utilizando plataformas ortogonais é crucial para a aplicação do seu potencial clínico. (Amado et al., 2013)

Bibliografia

- Acevedo, A. C. (2012). *Saliva and oral health. Revista da Associação Médica Brasileira* (Vol. 56). <http://doi.org/10.1590/S0104-42302010000100001>
- Amado, F. M. L., Ferreira, R. P., & Vitorino, R. (2013). One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clinical Biochemistry*, 46(6), 506–517. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.024>
- Ambatipudi, K. S., Swatkoski, S., Moresco, J. J., Tu, P. G., Anolik, J. H., Gucek, M., ... James, E. (2013). Quantitative Proteomics of Parotid Saliva in Primary Sjögren's Syndrome, 12(0), 3113–3120. <http://doi.org/10.1002/pmic.201200208>. Quantitative
- American Cancer Society. (2014). What is a breast cancer? Retrieved October 2, 2015, from <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>
- Armirotti, A., & Damonte, G. (2010). Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics*, 10(20), 3566–76. <http://doi.org/10.1002/pmic.201000245>
- Associação Portuguesa de Paramiloidose. (2015a). O que é? Retrieved October 20, 2015, from <http://www.paramiloidose.com/paramiloidose.php?a=2&id=1>
- Associação Portuguesa de Paramiloidose. (2015b). Quais os sintomas típicos da paramiloidose? Retrieved October 20, 2015, from <http://www.paramiloidose.com/paramiloidose.php?a=2&id=2>
- Association American Diabetes. (2015). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37(suppl_1), S37–S42. http://doi.org/10.2337/diacare.28.suppl_1.S37
- Barbosa, E. B., Vidotto, A., Polachini, G. M., Henrique, T., Trovó de Marqui, A. B., & Tajara, E. H. (2012). Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 58(3), 366–375. <http://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019>
- Baum, B. J., Yates, J. R., Srivastava, S., Wong, D. T. W., & Melvin, J. E. (2011). Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. *Advances in Dental Research*, 23(4), 360–368. <http://doi.org/10.1177/0022034511420433>
- Bencharit, S., Baxter, S. S., Carlson, J., Byrd, W. C., Mayo, V., Border, M. B., ... Buse, J. B. (2014). Salivary proteins associated with hyperglycemia in diabetes: a proteomic analysis, 9(11), 2785–2797. <http://doi.org/10.1039/c3mb70196d>. Salivary

- Border, M. B., Schwartz, S., Carlson, J., Dibble, C. F., Kohltfarber, H., Offenbacher, S., ... Bencharit, S. (2012). Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes. *Molecular bioSystems*, 8(4), 1304–10. <http://doi.org/10.1039/c2mb05079j>
- Bouma, G., Coppens, J. M. C., Lam-Tse, W.-K., Luini, W., Sintnicolaas, K., Levering, W. H., ... Versnel, M. a. (2005). An increased MRP8/14 expression and adhesion, but a decreased migration towards proinflammatory chemokines of type 1 diabetes monocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 141(3), 509–17. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02865.x>
- Cabras, T., Pisano, E., Boi, R., Olianias, A., Manconi, B., Inzitari, R., ... Messina, I. (2009). Age-dependent modifications of the human salivary secretory protein complex. *Journal of Proteome Research*, 8(8), 4126–34. <http://doi.org/10.1021/pr900212u>
- Cabras, T., Pisano, E., Mastinu, A., Denotti, G., Pusceddu, P. P., Inzitari, R., ... Messina, I. (2010). Alterations of the Salivary Secretory Peptidome Profile in Children Affected by Type 1 Diabetes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(10), 2099–2108. <http://doi.org/10.1074/mcp.M110.001057>
- Cabré, a, Lázaro, I., Girona, J., Manzanares, J., Marimón, F., Plana, N., ... Masana, L. (2007). Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Journal of Internal Medicine*, 262(4), 496–503. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01849.x>
- Castagnola, M., Cabras, T., Vitali, A., Sanna, M. T., & Messina, I. (2011). Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 409–418. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.002>
- Castagnola, M., Picciotti, P. M., Messina, I., Fanali, C., Fiorita, a, Cabras, T., ... Scarano, E. (2011). Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngologica Italica: Organo Ufficiale Della Società Italiana Di Otorinolaringologia E Chirurgia Cervico-Facciale*, 31(6), 347–57. <http://doi.org/unknown>
- Chambery, A., Farina, A., Di Maro, A., Rossi, M., Abbondanza, C., Moncharmont, B., ... Parente, A. (2006). Proteomic analysis of MCF-7 cell lines expressing the zinc-finger or the proline-rich domain of retinoblastoma-interacting-zinc-finger protein. *Journal of Proteome Research*, 5(5), 1176–1185. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16674107>

- Chandramouli, K., & Qian, P.-Y. (2009). Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. *Human Genomics and Proteomics*, 2009, 1–22. <http://doi.org/10.4061/2009/239204>
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & De Palo, E. F. (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 383(1-2), 30–40. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
- Constanzo, L. S. (2014). *Fisiologia*. (Elsevier, Ed.) (5º edição).
- De Almeida, P. D. V, Grégio, a. M. T., Machado, M. Â. N., De Lima, a. a S., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: A comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3), 072–080. <http://doi.org/1526-3711-497> [pii]
- Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., ... Hartwell, L. (2003). The case for early detection. *Nat.Rev.Cancer.*, 3(4), 243–252. Retrieved from <http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n4/full/nrc1041.html>
- Fabian, T., Fejerdy, P., & Csermely, P. (2008). Salivary Genomics, Transcriptomics and Proteomics: The Emerging Concept of the Oral Ecosystem and their Use in the Early Diagnosis of Cancer and other Diseases. *Current Genomics*, 9(1), 11–21. <http://doi.org/10.2174/138920208783884900>
- Faria, E. M. (2015). Farmácia Comunitária. Retrieved September 2, 2015, from http://www.ordemfarmaceuticos.pt/scid//ofWebStd_1/defaultCategoryViewOne.aspx?categoryId=1909
- Fernández-Real, J. M., & Pickup, J. C. (2008). Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(1), 10–16. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2007.10.004>
- Gambhir, K. K., Ornasir, J., Headings, V., & Bonar, A. (2007). Decreased total carbonic anhydrase esterase activity and decreased levels of carbonic anhydrase 1 isozyme in erythrocytes of type II diabetic patients. *Biochemical Genetics*, 45(5-6), 431–439. <http://doi.org/10.1007/s10528-007-9086-x>
- Giusti, L., Baldini, C., Ciregia, F., Giannaccini, G., Giacomelli, C., de Feo, F., ... Bombardieri, S. (2010). Is GRP78/BiP a potential salivary biomarker in patients with rheumatoid arthritis? *Proteomics - Clinical Applications*, 4(3), 315–324. <http://doi.org/10.1002/prca.200900082>
- Grad, F. P. (2002). The preamble of the constitution of the World Health Organization. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(12), 981–982. <http://doi.org/10.1590/S0042-96862002001200014>

- Guerreiro, A. (2010). *Proteômica da Paramiloidose*. Faculdade de Ciências.
- Guo, T., Oswald, L. M., Mendu, D. R., & Soldin, S. J. (2007). Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 375(1-2), 115–8. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2006.06.022>
- Gupta, A., Govila, V., & Saini, A. (2015). Proteomics – The research frontier in periodontics. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(1), 46–52. <http://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.01.001>
- Gustafsson, J. O. R., Oehler, M. K., Ruszkiewicz, A., McColl, S. R., & Hoffmann, P. (2011). MALDI Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS)—Application of Spatial Proteomics for Ovarian Cancer Classification and Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 773–794. <http://doi.org/10.3390/ijms12010773>
- Häkkinen, L., Uitto, V. J., & Larjava, H. (2000). Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology* 2000, 24, 127–152. <http://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240107.x>
- Hammond, M. E., Hayes, D. F., & Wolff, A. C. (2011). Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(15), e458. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.2245>
- Han, X., Aslanian, A., & Yates, J. (2008). NIH Public Access. *Curr Opin Chem Biol.*, 12(5), 483–490. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>
- Hegele, R. A. (2007). Phenomics, Lamin A/C, and Metabolic Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(12), 4566–4568. <http://doi.org/10.1210/jc.2007-2078>
- Helmerhorst, E. J., Sun, X., Salih, E., & Oppenheim, F. G. (2008). Identification of Lys-Pro-Gln as a Novel Cleavage Site Specificity of Saliva-associated Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (29), 19957–19966. <http://doi.org/10.1074/jbc.M708282200>
- Hinestrosa, M. C., Dickersin, K., Klein, P., Mayer, M., Noss, K., Slamon, D., ... Visco, F. M. (2007). Shaping the future of biomarker research in breast cancer to ensure clinical relevance. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 309–315. <http://doi.org/10.1038/nrc2113>

- Hirtz, C., Chevalier, F., Sommerer, N., & Raingeard, I. (2006). Salivary Protein Profiling in Type 1 Diabetes Using Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Clinical Proteomics*, 00, 117–127. <http://doi.org/10.1385/CP:2:1:117>
- Hogan, P., Dall, T., & Nikolov, P. (2003). Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care*, 26(3), 917–32. <http://doi.org/10.2337/diacare.26.3.917>
- Hogue, J.-C., Lamarche, B., Tremblay, A. J., Bergeron, J., Gagné, C., & Couture, P. (2007). Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *Journal of Lipid Research*, 48(6), 1336–1342. <http://doi.org/10.1194/jlr.M600548-JLR200>
- Hudelist, G., Singer, C. F., Pischinger, K. I. D., Kaserer, K., Manavi, M., Kubista, E., & Czerwenka, K. F. (2006). Proteomic analysis in human breast cancer: identification of a characteristic protein expression profile of malignant breast epithelium. *Proteomics*, 6(6), 1989–2002. <http://doi.org/10.1002/pmic.200500129>
- Humphery-Smith, I. (2004). A human proteome project with a beginning and an end. *Proteomics*, 4(9), 2519–2521. <http://doi.org/10.1002/pmic.200400866>
- Humphery-Smith, I. (2015). The 20th anniversary of proteomics and some of its origins. *Proteomics*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1002/pmic.201400582>
- Inzitari, R., Cabras, T., Rossetti, D. V., Fanali, C., Vitali, A., Pellegrini, M., ... Castagnola, M. (2006). Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives. *Proteomics*, 6(23), 6370–9. <http://doi.org/10.1002/pmic.200600395>
- Joseph, G., Tarnow, L., Astrup, A. S., Hansen, T. K., Parving, H.-H., Flyvbjerg, A., & Frystyk, J. (2008). Plasma alpha-defensin is associated with cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(4), 1470–5. <http://doi.org/10.1210/jc.2007-1910>
- Lee, Y. H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, 22(4), 241–248. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>
- Levenson, V. (2007). Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1770(6), 847–856. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.01.017>
- Li, R.-X., Chen, H.-B., Tu, K., Zhao, S.-L., Zhou, H., Li, S.-J., ... Wu, J.-R. (2008). Localized-statistical quantification of human serum proteome associated with type 2 diabetes. *PloS One*, 3(9), e3224. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003224>

- Li, Y. (2006). Serum Circulating Human mRNA Profiling and Its Utility for Oral Cancer Detection. *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), 1754–1760. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.7598>
- Liga Portuguesa Contra o Cancro. (n.d.-a). Cancro da Mama. Retrieved October 2, 2015, from <http://www.ligacontracancro.pt/gca/index.php?id=14>
- Liga Portuguesa Contra o Cancro. (n.d.-b). Cancro da Mama: Quem está em risco. Retrieved October 2, 2015, from <http://www.ligacontracancro.pt/gca/index.php?id=179>
- Liga Portuguesa Contra o Cancro. (n.d.-c). Forma de diagnóstico do Cancro da Mama. Retrieved October 2, 2015, from <http://www.ligacontracancro.pt/gca/index.php?id=183>
- Lisowska-Myjak, B., Pachecka, J., Kaczyńska, B., Miszkurka, G., & Kadziela, K. (2006). Serum protease inhibitor concentrations and total antitrypsin activity in diabetic and non-diabetic children during adolescence. *Acta Diabetologica*, 43(4), 88–92. <http://doi.org/10.1007/s00592-006-0220-8>
- Majid Suhail, M. shafi. (2014). Saliva as a diagnostic tool : a review, 9(1), 9–14.
- Malathi, N., Mythili, S., & Vasanthi, H. R. (2014). Salivary diagnostics: a brief review. *ISRN Dentistry*, 2014, 158786. <http://doi.org/10.1155/2014/158786>
- May, C., Brosseron, F., Chartowski, P., Schumbrutzki, C., Schoenebeck, B., & Marcus, K. (2011). Instruments and methods in proteomics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 696, 3–26. http://doi.org/10.1007/978-1-60761-987-1_1
- Messana, I., Cabras, T., Pisano, E., Sanna, M. T., Olianias, A., Manconi, B., ... Castagnola, M. (2008). Trafficking and postsecretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 7(5), 911–26. <http://doi.org/10.1074/mcp.M700501-MCP200>
- Ng, D. P. K., Koh, D., Choo, S., & Chia, K.-S. (2006). Saliva as a viable alternative source of human genomic DNA in genetic epidemiology. *Clinica Chimica Acta*, 367(1-2), 81–85. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2005.11.024>
- Organización Mundial de la Salud. (1993). El Papel del Farmacéutico en el Sistema de Atención de Salud. *La Organización Mundial de La Salud*, 1–35. Retrieved from <http://www.ops.org.bo/textocompleto/ime9848.pdf>
- Oudhoff, M. J., Kroeze, K. L., Nazmi, K., van den Keijbus, P. a M., van 't Hof, W., Fernandez-Borja, M., ... Veerman, E. C. I. (2009). Structure-activity analysis of

- histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1,000-fold. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23, 3928–3935. <http://doi.org/10.1096/fj.09-137588>
- Perez-Cornejo, P., Gokhale, A., Duran, C., Cui, Y., Xiao, Q., Hartzell, H. C., & Faundez, V. (2012). Anoctamin 1 (Tmem16A) Ca²⁺-activated chloride channel stoichiometrically interacts with an ezrin-radixin-moesin network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10376–10381. <http://doi.org/10.1073/pnas.1200174109>
- Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., & Punyadeera, C. (2011). Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clinical Chemistry*, 57(5), 675–687. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>
- Pickup, J. C., & Crook, M. a. (1998). Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, 41(10), 1241–1248. <http://doi.org/10.1007/s001250051058>
- Pucci-Minafra, I., Cancemi, P., Fontana, S., Minafra, L., Feo, S., Becchi, M., ... Minafra, S. (2006). Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. *Proteomics*, 6(8), 2609–25. <http://doi.org/10.1002/pmic.200500627>
- Quintas, A., Freire, A. P., Videira, A., Azevedo, C., Oliveira, D., R., C., & Halpern, M. J. (2008). *Bioquímica*. (LIDEL, Ed.).
- Rahim, M. A. A., Rahim, Z. H. A., Ahmad, W. A. W., & Hashim, O. H. (2015). Can Saliva Proteins Be Used to Predict the Onset of Acute Myocardial Infarction among High-Risk Patients? *International Journal of Medical Sciences*, 12(4), 329–335. <http://doi.org/10.7150/ijms.11280>
- Rao, P. V., Lu, X., Standley, M., Pattee, P., Neelima, G., Girishesh, G., ... Nagalla, S. R. (2007). Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 30(3), 629–637. <http://doi.org/10.2337/dc06-2056>
- Rao, P. V., Reddy, A. P., Lu, X., Dasari, S., Krishnaprasad, A., Biggs, E., ... Nagalla, S. R. (2009). Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *Journal of Proteome Research*, 8, 239–245. <http://doi.org/10.1021/pr8003776>
- Rodriguez-Chavez, & R., and D. M. and I. (2012). Saliva as a Diagnostic Fluid, 55(1), 159–178. <http://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.004>.Saliva
- Saraheimo, M., Forsblom, C., Pettersson-Fernholm, K., Flyvbjerg, a, Groop, P.-H., &

- Frystyk, J. (2008). Increased levels of alpha-defensin (-1, -2 and -3) in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 23(3), 914–8. <http://doi.org/10.1093/ndt/gfm711>
- Scarano, E., Fiorita, a, Picciotti, P. M., Passali, G. C., Calò, L., Cabras, T., ... Paludetti, G. (2010). Proteomics of saliva: personal experience. *Acta Otorhinolaryngologica Italica: Organo Ufficiale Della Societa Italiana Di Otorinolaringologia E Chirurgia Cervico-Facciale*, 30(3), 125–130.
- Sciences, N. I. of G. M. (2012). Circadian Rhythms Fact Sheet. Retrieved September 14, 2015, from http://www.nigms.nih.gov/Education/Pages/Factsheet_CircadianRhythms.aspx
- Shirtcliff, E. a, & Marrocco, R. T. (2003). Salivary cotinine levels in human tobacco smokers predict the attentional validity effect size during smoking abstinence. *Psychopharmacology*, 166(1), 11–8. <http://doi.org/10.1007/s00213-002-1293-x>
- Somiari, R. I., Sullivan, A., Russell, S., Somiari, S., Hu, H., Jordan, R., ... Shriver, C. (2003). High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics*, 3(10), 1863–73. <http://doi.org/10.1002/pmic.200300560>
- Stoeger, Z. M., Bezalel, S., Chapnik, N., Asher, I., & Froy, O. (2009). High alpha-defensin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology*, 127(1), 116–22. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02997.x>
- Streckfus, C., Bigler, L., Dellinger, T., Dai, X., Kingman, A., & Thigpen, J. T. (2000). The Presence of Soluble c-erb B-2 in Saliva and Serum among Women with Breast Carcinoma: A Preliminary Study The Presence of Soluble c-erbB-2 in Saliva and Serum among Women with Breast Carcinoma: A Preliminary Study 1, 6(June), 2363–2370.
- Streckfus, C. F., Arreola, D., Edwards, C., & Bigler, L. (2012). Salivary Protein Profiles among HER2/neu-Receptor-Positive and -Negative Breast Cancer Patients: Support for Using Salivary Protein Profiles for Modeling Breast Cancer Progression. *Journal of Oncology*, 2012, 413256. <http://doi.org/10.1155/2012/413256>
- Streckfus, C. F., Mayorga-Wark, O., Arreola, D., Edwards, C., Bigler, L., & Dubinsky, W. P. (2008). Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Investigation*, 26(2), 159–67. <http://doi.org/10.1080/07357900701783883>
- Strimbu, K., & Tavel, J. a. (2011). What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6),

- 463–466. <http://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>. What
- Tate, P.; Seeley, R.; Stephens, T. (2011). *Anatomia e Fisiologia*. (Lusociencias, Ed.) (8^o ed.).
- Veerman, E.C.I, Keybus, P. A. M., Amerongen, A. V. (1996). Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *European Journal of Oral Sciences*, 104. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00090.x>
- Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Gholami, A. M., Lieberenz, M., Savitski, M. M., ... Kuster, B. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 582–587. <http://doi.org/10.1038/nature13319>
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., ... Hayes, D. F. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 131(1), 18–43. [http://doi.org/10.1043/1543-2165\(2007\)131\[18:ASOCCO\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1043/1543-2165(2007)131[18:ASOCCO]2.0.CO;2)
- Wong, Shen Hu, Joseph A. Loo, D. T. (2010). Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*, 6(23), 6326–6353. <http://doi.org/10.1002/pmic.200600284>. Human
- Wu, Z. Z., Wang, J. G., & Zhang, X. L. (2009). Diagnostic model of saliva protein fingerprint analysis of patients with gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 15, 865–870. <http://doi.org/10.3748/wjg.15.865>
- Xiao, H., Zhang, L., Zhou, H., Lee, J. M., Garon, E. B., & Wong, D. T. (2012). Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 11(2), M111012112. <http://doi.org/10.1074/mcp.M111.012112>
- Yu, T., Zhou, H., Henry, S., Vissink, A., Pijpe, J., Kallenberg, C., ... Wong, D. T. (2010). Salivary Proteomic and Genomic Biomarkers for Primary Sjogren's Syndrome, 56(11), 3588–3600. <http://doi.org/10.1002/art.22954>. Salivary
- Zauber, H., Mosler, S., Heßberg, A. von, & Schulze, W. X. (2012). Dynamics of salivary proteins and metabolites during extreme endurance sports - a case study. *Proteomics*, 12(13), 2221–2235. <http://doi.org/10.1002/pmic.201100228>
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., & Wang, X. (2013). Salivary proteomics in biomedical research. *Clinica Chimica Acta*, 415, 261–265. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.001>
- Zhang, A., Sun, H., & Wang, X. (2012). Saliva metabolomics opens door to biomarker

discovery, disease diagnosis, and treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(6), 1718–27. <http://doi.org/10.1007/s12010-012-9891-5>

Zhang, L., Xiao, H., Karlan, S., Zhou, H., Gross, J., Elashoff, D., ... Wong, D. T. (2010). Discovery and Preclinical Validation of Salivary Transcriptomic and Proteomic Biomarkers for the Non-Invasive Detection of Breast Cancer. *PLoS ONE*, 5(12), e15573. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015573>

Anexos

Anexo I

Accession	Protein name	Ratio	p Value	Gene ID
Up-Regulated Proteins in Cancer				
Q9HC84	Mucin 5B precursor	1.16	0.0046	MUC5B
P80188	Iipocalin precursor	1.18	0.0443	NGAL
P01871	Ig mu chain C region	1.19	0.0231	MUC
P04745	Salivary alpha-amylase precursor	1.19	0.001	AMYS
P23280	Carbonic anhydrase VI precursor	1.29	0.0293	CAH6
P02788	Lactotransferrin precursor	1.30	0.0113	TRFL
P05164	Myeloperoxidase precursor	1.41	0.0487	PERM
P01857	Ig gamma-1 chain C region	1.43	0.0004	IGHG1
Q9DCT1	Aldo-keto reductase	1.47	0.018	AK1E1
P31025	Von Ebner's gland protein	1.55	0.0005	VEGP
P04083	Annexin A1	1.86	0	ANXA1
P10599	Thioredoxin	1.93	0.03	THIO
P01040	Cystatin A	1.95	0.0056	CYTA
P48666	Keratin, type II cytoskeletal 6C	2.07	0	K2C6C
P31151	S100 calcium-binding protein A7	4.08	0.0005	S10A7
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	4.76	0	K1CM
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4	5.59	0.0013	K2C4
Down-Regulated Proteins in Cancer				
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	0.42	0	K2C1
Q9QWL7	Keratin, type I cytoskeletal 17	0.58	0.001	K1CQ
P01034	Cystatin C precursor	0.67	0.0246	CYTC
P13796	L-plastin	0.69	0.0145	PLSL
P06733	Alpha enolase	0.73	0.0106	ENOA
P01833	Polymeric-Ig receptor	0.76	0.0002	PIGR
P12273	Prolactin-inducible protein precursor	0.77	0.0012	PIP
Q96DR5	Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma associated protein 2 precursor	0.78	0.0219	SPLC2
P07477	Trypsin I precursor	0.82	0.0196	TRY1
P28325	Cystatin D precursor	0.83	0.0155	CYTD
Q9UBC9	Small proline-rich protein 3	0.84	0.0228	SPRR3

Anexo II

Accession Number	Protein Name	Ratio	P Value	Gene ID	Reported Function	Blood (Ref.)	Tissue (Ref.)
Up-Regulated Proteins in Cancer Saliva							
Q9DCT1	Aldo-keto reductase	1.44	0.0264	AK1E1	Detox & reduction	—	25
P04083	Annexin A1	3.06	0.0001	ANXA1	Membrane associated protein	30	25
P05109	Calgranulin A	2.18	0.0001	S10A8	Cell adhesion & communication	30	—
P06702	Calgranulin B	1.87	0.0001	S10A9	Cell adhesion & communication	30	—
P23280	Carbonic anhydrase VI	1.52	0.0003	CAH6	Energy/metabolism	30	27
Q9UBC9	Cornifin beta	1.82	0.0001	SPRR3	Indicator of tissue damage	—	—
P13646	Cytokeratin 13	6.56	0.0001	K1CM	Intracytoplasmatic cytoskeleton protein	30	—
P19013	Cytokeratin 4	6.50	0.0019	K2C4	Intracytoplasmatic cytoskeleton protein	30	25
P48666	Cytokeratin 6C	4.41	0.0001	K2C6C	Intracytoplasmatic cytoskeleton protein	—	—
P01040	Cystatin Ad	2.00	0.0014	CYTA	Protein degradation & inhibitor	30	25
P01036	Cystatin SA-III	1.20	0.0115	CYTS	Protein degradation & inhibitor	—	—
Q01469	Epid. Fatty acid-binding prot.	2.1	0.0362	FABP4	Protein with binding functions	30	—
P01857	Ig gamma-1 chain C region	1.44	0.0034	IGHG1	Immunoresponse	—	—
P01871	Ig mu chain C region	1.51	0.0011	MUC	Immunoresponse	—	—
P06870	Kallikrein 1 precursor	1.23	0.0425	KLK1	Serine protease	—	—
P02788	Lactoferrin	1.58	0.0001	TRFL	Inhibits G1 CDK's, mod. NK activity	30	26
Q9HC84	Mucin 5B	1.68	0.0001	MUC5B	Cell adhesion & communication	—	36
P05164	Myeloperoxidase precursor	2.72	0.0005	PERM	Defense Immunoresponse	30	—
P31151	S100 calcium-binding protein	2.05	0.0001	S100P	Calcium binding protein	30	25
P31025	Von Ebner's gland protein (lipocalin)	1.26	0.0043	VEGP	Inflamation	—	25
Down-Regulated Proteins in Cancer Saliva							
Q8N4F0	Bact. Perm.-increasing prot.- 1	0.80	0.0004	BPIL1	Transport	30	—
P04264	Cytokeratin 1	0.61	0.0001	K2C1	Intracytoplasmatic cytoskeleton protein	—	25
P01034	Cystatin C	0.72	0.0187	CYTC	Inhibitor of cysteine proteases	—	31
P28325	Cystatin D precursor	0.68	0.001	CYTD	Protein degradation & inhibitor	—	—
P00738	Haptoglobin	0.83	0.0023	HPT	Indicator of tissue damage and necrosis	30, 34	—
P22079	Lactoperoxidase	0.82	0.0388	PERL	Transport	—	33
P01833	Poly-Ig receptor protein	0.86	0.0234	PIGR	Immunoresponse	—	—
P07737	Profilin-1	0.68	0.0135	PROF1	Cytoskeleton associated	—	25
P02768	Serum albumin precursor	0.73	0.0001	ALBU	Transport	30	27
Q96DR5	Short palate, lung and nasal epith. carc. assoc. protein 2	0.61	0.0001	SPLC2	Immune response & detox.	—	32
P02787	Transferrin	0.72	0.0001	TRFE	Surface antigen assoc. with growth	34	—
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0.84	0.0009	ZA2G	Signalling	—	29

