



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

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **A SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO**

Trabalho submetido por  
**Flávia Irene Farinha**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Junho de 2015**





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

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **A SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO**

Trabalho submetido por  
**Flávia Irene Farinha**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Doutor Pedro Miguel Antunes Oliveira**

**Junho de 2015**



## **Agradecimentos**

Ao Prof. Doutor Pedro Oliveira, por me ter dado a possibilidade de ser sua orientanda, por toda a disponibilidade, paciência e dedicação durante o desenvolvimento deste projeto.

A todos os Professores do ISCSEM, pelos conhecimentos transmitidos e pela sua contribuição para a minha formação académica e pessoal.

Aos meus pais e ao meu irmão, um enorme obrigada por todo o carinho, amor e apoio que sempre me dedicaram ao longo dos anos. Agradeço-lhes ainda por todos os valores que me inculcaram e que me tornaram na pessoa que sou.

A toda a minha família na Madeira e na África do Sul, pelo incentivo e pela força constante, o que me ajudou a ultrapassar a distância e a saudade.

A todos os meus amigos, um muito obrigado por toda a ajuda, por todo o companheirismo e por todas as memórias que guardarei, para sempre, com carinho.



## **RESUMO**

A detecção precoce da doença desempenha um papel fundamental para a formulação de um correto plano de tratamento e prognóstico. A saliva constitui um fluido biológico complexo com uma variedade de componentes, muitos dos quais são provenientes da vascularização das glândulas salivares e fluido crevicular, que poderão refletir o estado fisiológico do corpo humano. Estes componentes podem atuar como biomarcadores para o diagnóstico e monitorização de várias doenças sistêmicas e orais, bem como para a monitorização de níveis terapêuticos de medicamentos e detecção de drogas ilícitas. Devido a estas particularidades, a saliva tem vindo a ganhar cada vez mais interesse pelos investigadores como ferramenta de diagnóstico, uma vez que apresenta vantagens distintas sobre os métodos tradicionais de análise sanguínea ou urinária, podendo ser coletada de forma não invasiva, rápida, confortável, económica e facilmente coletada por indivíduos com formação limitada através do uso de aparelhos simples.

Palavras chave: diagnóstico salivar, biomarcadores, doenças sistêmicas, doenças orais





## **ABSTRACT**

Early detection of diseases plays a key role in the formulation of a correct treatment plan and prognosis. Saliva is a complex biological fluid with a variety of components, many of which are derived from the vascularization of the salivary glands and crevicular fluid, which may reflect the physiological state of the human body. These components may act as biomarkers for the diagnosis and the monitorization of various systemic and oral diseases as well as for the monitoring of therapeutic drug levels and for the detection of illicit drugs. Due to these characteristics, saliva has gained increasing interest by researchers as a diagnostic tool since it has distinct advantages over traditional methods of analyzing blood or urine, and may be collected noninvasively, quickly, comfortably, economically and easily by individuals with limited training by using simple devices.

Key words: salivary diagnosis, biomarkers, systemic diseases, oral diseases



## ÍNDICE

I - Introdução .....	15
II - Desenvolvimento .....	18
Propriedades e fisiologia da Saliva.....	18
Transferência de biomoléculas do sangue para a saliva .....	20
□ Difusão .....	20
□ Transporte Ativo.....	21
□ Ultrafiltração.....	21
Saliva Versus Sangue .....	23
Colheita Salivar .....	25
Diagnóstico Salivar .....	28
Potencias biomarcadores salivares .....	32
Doenças Sistémicas .....	32
1. Oncologia .....	32
1.1. Cancro da Mama .....	32
2. Doenças Cardiovasculares.....	34
3. Diabetes .....	38
4. Doenças Autoimunes.....	42
4.1. Síndrome Sjogren.....	42
4.2. Esclerose Múltipla.....	45
5. Diagnóstico salivar para a deteção e monitorização de drogas e medicamentos. 47	
6. Doenças infecciosas .....	51
6.1. Infeções virais .....	52
6.2. Infeções bacterianas .....	54
Doenças Orais.....	55
1. Cancro Oral.....	55
2. Doença periodontal.....	63

3. Cárie Dentária.....	74
III - Conclusão .....	77
IV- Bibliografia .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das glândulas salivares .....	18
Figura 2 - Mecanismo de transporte molecular do sangue para as glândulas .....	22
Figura 3- Colheita de saliva total pelo método de centrifugação .....	26
Figura 4- Biomarcadores com concentração aumentada na saliva durante a inflamação local e sistêmica.....	30
Figura 5- Diagrama esquemático do mecanismo ocorrido no IgA e IgG.....	36
Figura 6- Sondagem periodontal .....	64
Figura 7- Teste salivar para o diagnóstico periodontal.....	65

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Aparelhos comuns para o diagnóstico salivar .....	27
Tabela 2 - Produtos comerciais disponíveis no EUA para o diagnóstico Salivar .....	29
Tabela 3 -Deteção salivar de drogas e outros medicamentos .....	50
Tabela 4- Biomarcadores salivares para a deteção de cancro oral reportadas desde 2013 .....	57
Tabela 5- Biomarcadores salivares na doença periodontal .....	66
Tabela 6 - Biomarcadores salivares na doença periodontal (continuação) .....	67
Tabela 7- Enzimas derivadas do hospedeiro no FCG.....	67
Tabela 8- Mediadores inflamatórios e resposta modificadora do hospedeiro no FCG ..	68
Tabela 9- Podutos de degradação de tecidos no FCG .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AOS- Apneia obstrutiva do sono

ALH- Antígeno Leucocitário Humano

CK-MB- Creatina quinase

CPR- Cadeia Polimerase de Reação

CTn- Troponinas cardíacas

DUPSI - *dual specificity phosphate I*

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EM- Esclerose Múltipla

EMRR- Esclerose Múltipla Recidivante Remitente

ES- Esclerose Sistêmica

FDA- *Food and Drug Administration*

HbA1c- hemoglobina glicolisada

H3F3A- histona h3 da família 3A

HER-2- fator de crescimento epidérmico humano

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

IAM- Infarto Agudo do Miocárdio

IFN- Interferão

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina

LES- Lúpus Eritematoso Sistêmico

LIPS- *Luciferase Immunoprecipitation System*

LTAM- Linfoma do tecido linfoide associada a mucosa

MIP- proteínas inflamatória de macrófago

MMP- Proteína de Matriz Metaloproteinase

MYO – Mioglobulina

OAZ1 -*Ornithine descarboxylase antizyme 1*

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPG - Osteoprotegerina

COCE- Carcinoma oral de células escamosas

PCR- Proteína C reativa

RANK- Ativador de recetor do fator kappa B nuclear

RANKL- Ativador de recetor do fator kappa B nuclear ligando

RANKLs- Ativador de recetor do fator kappa B nuclear solúvel

SAT - *spermidine/ spermine N1-acetyltransferase*

SCA- Síndrome Coronária Aguda

SSJ - Síndrome de Sjogren

SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SSP – Síndrome de Sjogren Primária

S100P -S 100 calcium binding protein P

TLR- Recetor tipo toll

TNF- Fator de necrose tumoral

VHC- Vírus da Hepatite C

VPH- Vírus do Papiloma Humano



## **I - Introdução**

A deteção precoce da doença desempenha um papel crucial no sucesso da terapia. Segundo Lee e Wong (2010), na maioria dos casos quanto mais cedo é o diagnóstico da doença maiores são as probabilidades de sucesso a nível do tratamento e controlo, reduzindo drasticamente a severidade do seu impacto na vida dos doentes permitindo também adiar possíveis complicações. Existem várias doenças com alta taxa de morbilidade e mortalidade que são difíceis de diagnosticar sem exames auxiliares de diagnóstico como o caso do cancro, doenças cardiovasculares, metabólicas e doenças neurológicas (Zhang et al., 2014). Por exemplo, em Portugal, segundo um estudo realizado por Monteiro, Amaral, Vizcaíno e Lopes (2014), na última década, na população portuguesa tem havido uma tendência crescente para o cancro oral. Em 2007 foram relatados mais de 1.200 casos de cancro oral, no lábio e orofaringe. O estudo realizado por Monteiro et al. (2014) foi feito numa população de 128 doentes diagnosticados com carcinomas de células escamosas no Centro Hospitalar do Porto. Constatou-se que 43,8% morreu devido ao estado avançado do cancro oral, o que reflete a grande necessidade de diagnóstico precoce desta patologia e acesso a tratamentos menos caros (Monteiro et al., 2014). Segundo o autor Zhang et al. (2014) existem três barreiras que impedem a utilização da saliva na realização de diagnósticos clínicos: a falta de biomarcadores definitivos específicos para as doenças; métodos simples minimamente invasivos a baixo custo; e a falta de um diagnóstico exato, portátil e fácil de manusear. A saliva tem vindo a tornar um fluido corporal altamente desejável para o desenvolvimento de biomarcadores para aplicações clínicas ultrapassando as três barreiras mencionadas (Zhang et al., 2014).

Segundo Malamud e Isaac (2012) e Wong, Garon e Lee (2010) a saliva é ideal para a deteção precoce de doenças, através da descoberta de biomarcadores e desenvolvimento de tecnologias para o diagnóstico salivar, que desempenham um papel fundamental na deteção de doenças sistémicas e orais. Estes biomarcadores são indicadores de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas de intervenções terapêuticas e encontram-se em diferentes formas: como anticorpos, DNA, RNA, lípidos, metabolitos e moléculas proteicas. Uma vez que a saliva é rica em proteínas e moléculas genéticas, torna-se clinicamente informativo pois estas são filtrados, processadas e secretadas a partir das glândulas salivares. A passagem

destes constituintes do sangue para a saliva é realizada por vários mecanismos extracelulares, como a ultrafiltração, e intracelulares, como a difusão passiva e transporte ativo. Desta forma muitos componentes que são encontrados no sangue são também encontrados na saliva (Lee & Wong, 2010; (Pfaffe, Cooper-white, Beyerlein, Kostner, & Punyadeera, 2011).

Considera-se assim que a saliva é um fluido biológico complexo que contém uma variedade de hormonas, proteínas, enzimas, anticorpos, constituintes antimicrobianos e citoquinas (Malathi, Mythili, & Vasanthi, 2014). Segundo Lee et al. (2010), a saliva poderá ser considerada o “espelho do corpo” podendo refletir praticamente todo o espectro de estados fisiológicos como estados de doenças. Torna-se assim um fluido clinicamente informativo e útil para abordagens a nível de prognóstico, laboratório ou diagnóstico clínico.

Estes biomarcadores apesar de encontrados na maioria no sangue e na urina, despertou especial interesse aos cientistas para investigar a saliva como um meio de diagnóstico uma vez que estes biomarcadores também são encontrados na saliva. Recentemente tem havido descobertas de um grande número de moléculas medicamente valiosas na saliva devido à combinação de biotecnologias emergentes e diagnóstico salivar, sendo que algumas destas moléculas representam biomarcadores para várias doenças incluindo o cancro, doenças auto imunes, doenças virais, doenças bacterianas, doenças cardiovasculares, HIV e doenças metabólicas). Adicionalmente a saliva permite através destes biomarcadores que os doentes sejam monitorizados e controlados (Lee & Wong, 2010; Malamud & Isaac, 2012; Malathi et al., 2014; Segal & Wong, 2009).

Desta forma, a saliva surge como uma ferramenta de diagnóstico, que possui a vantagem de ser coletada facilmente e de forma não invasiva, o que diminui o desconforto quando associada a colheita de sangue e também melhora em termos de privacidade quando associada a colheita de urina. O diagnóstico salivar tem uma variedade de vantagens quando comparadas com o soro. Para além da sua facilidade de colheita, armazenamento e transporte, pode ser obtida a baixo custo em quantidades menores e satisfatórias, a sua obtenção para amostras repetidas para a monitorização ao longo do tempo é simplificada e oferece segurança para os profissionais de saúde aquando do seu diagnóstico e manuseamento (Lee & Wong, 2010; Malathi et al., 2014).

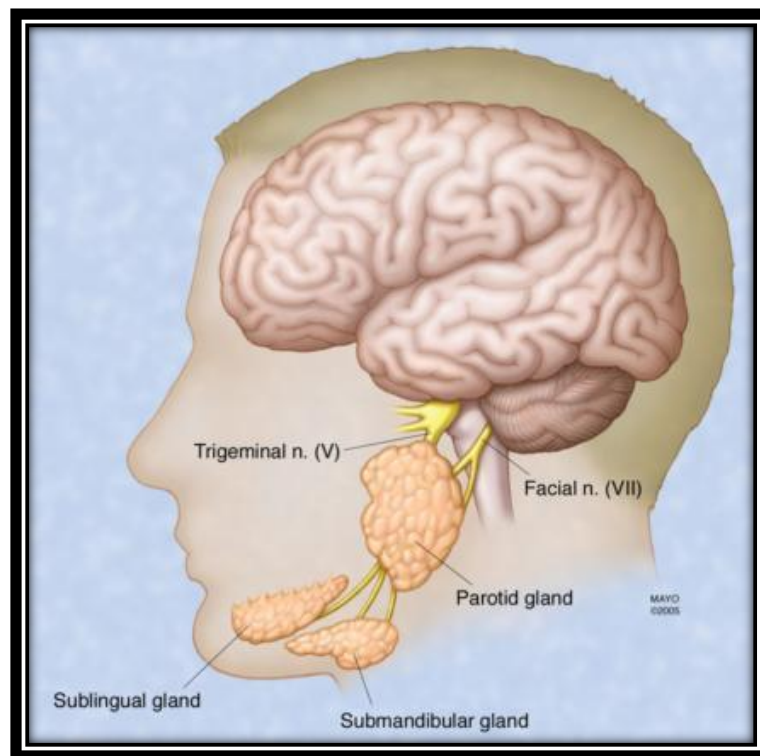
Assim o diagnóstico salivar esta na vanguarda da tecnologia de diagnóstico e pode oferecer uma alternativa favorável para os médicos utilizarem no futuro próximo, para tomar decisões clínicas e prever resultados pós-tratamentos (Lee & Wong, 2010).

## II - Desenvolvimento

### Propriedades e fisiologia da Saliva

A saliva é um fluido biológico secretada por glândulas major e minor. As glândulas major resultam de três pares de glândulas – a parótida, a submandibular e as glândulas sublinguais (figura 1). Relativamente às glândulas minor constituem centenas de glândulas acessórias localizadas na língua, palato e mucosas orais (Zolotukhin. S, 2014).

**Figura 1** - Localização das glândulas salivares



Adaptado de Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities, 2013.

Glândula Sublingual, Glândula Submandibular, Glândula Parótida, Nervo Trigêmio, Nervo Facial

A saliva humana tem uma aparência clara e um pH ligeiramente ácido (pH 6,0 – 7,0) sendo 99% constituída por água, 0,3% de proteínas e substâncias inorgânicas. Aproximadamente 1L-1,5L é produzido diariamente por um indivíduo, o que resulta numa média de 0,3-0,7ml de saliva por minuto. No entanto, existem várias condições fisiológicas e patológicas que podem modificar a nível da qualidade e quantidade, a

produção salivar (Adriane, Moura, Rafael, & Iii, 2007; Lee & Wong, 2010; Ptaffe et al., 2011; Yoshizawa et al., 2013).

Segundo os autores Deepa e Thirrunavukkarasu, (2010) e Moura et al. (2007) a saliva pode ser classificada como saliva total ou como saliva de glândula específica, coletada diretamente de uma glândula. A saliva de glândula específica são secreções de glândulas individuais que são úteis principalmente para a detecção de patologias específicas como a infecção e obstrução de glândulas. Em relação saliva total é um fluido misturado mais utilizado para o estudo de desordens sistêmicas devido ao facto de ser predominantemente proveniente de glândulas major e minor. No entanto, é de salientar que este também contém outros componentes como fluido crevicular, transudato da mucosa, secreções brônquicas e nasais, bactérias e fungos, derivados de sangue proveniente de feridas, entre outros (Farnaud, Kosti, Getting, & Renshaw, 2010).

As glândulas salivares são inervadas pela estimulação dos sistemas simpático e parassimpático através da libertação de neurotransmissores. Esta estimulação leva a secreção salivar em três grandes tipos de células secretoras: acinar mucosa, células ductais e acinar serosa. Nas glândulas sublinguais temos predominantemente células mucosas que produzem uma secreção rica em mucina, enquanto na secreção da glândula parótida existem mais células serosas, sendo esta uma secreção mais aguada e viscosa (Macedo & Nunes 2013; Zolutkhin.S, 2014; ).

No que toca as funções salivares esta é multifuncional, possui um importante papel tanto a nível da fisiologia do sistema digestivo facilitando a digestão, deglutição, degustação e lubrificação que facilita movimentos linguais e labiais durante a alimentação, como também protege as mucosas e tecidos contra a invasão de diversas substâncias formando uma barreira protetora contra bactérias patogénicas (Moura et al., 2007; Yoshizawa et al., 2013;).

## **Transferência de biomoléculas do sangue para a saliva**

As glândulas salivares são muito permeáveis a diversos componentes do sangue e circundados por vasos capilares. Devido a estas características existe a passagem e troca de moléculas provenientes do sangue com as células produtoras de saliva adjacentes, as células acinares (Figura 2). Os investigadores postulam que devido às formas de transporte por via transcelular ou por via paracelular, as moléculas derivadas do sangue entram nos tecidos salivares influenciando os componentes moleculares dos fluidos orais. Desta forma, surge a hipótese dos fluidos orais conterem informação molecular capaz de comunicar o estado de saúde atual de um indivíduo, devido à circulação de biomarcadores possivelmente absorvidas pelas glândulas salivares o que poderá alterar a nível bioquímico a composição das secreções salivares. No entanto, este mecanismo para explicar a etiologia dos biomarcadores à base de saliva ainda precisa de ser provado (Wang et al., 2013; Yoshizawa et al., 2013).

A entrada dos componentes do plasma envolve vários processos tanto intracelulares como extracelulares (Ptaffe et al., 2011; Macedo & Nunes, 2013):

- **Difusão**

A via de difusão passiva, é a rota mais comum para a migração de substâncias provenientes do sangue para a saliva. Os capilares que circundam as glândulas salivares facilitam a entrada de moléculas pequenas devido à sua elevada porosidade. Uma molécula do soro de forma a chegar à saliva por difusão necessita de passar por cinco barreiras: a parede capilar, o espaço intersticial, a membrana basal da célula acinosa, o citoplasma da célula acinosa e a membrana luminal da célula. De forma a ultrapassar estas barreiras, a capacidade da molécula de difundir passivamente depende em parte do seu tamanho e também da sua carga elétrica. Moléculas polares dificilmente conseguem ultrapassar as membranas das células ductais devido a sua camada fosfolipídica. Desta forma, moléculas relativamente pequenas em tamanho como hormonas esteróides e drogas têm facilidade em ultrapassar as membranas por difusão. No caso das hormonas esteróides a maioria é composta por ácidos gordos o que facilita a sua passagem por difusão, já moléculas portadoras de proteínas de grande tamanho como a albumina do

soro, são demasiado grandes para entrar nesta via (Ptaffe et al., 2011; Wang et al., 2013).

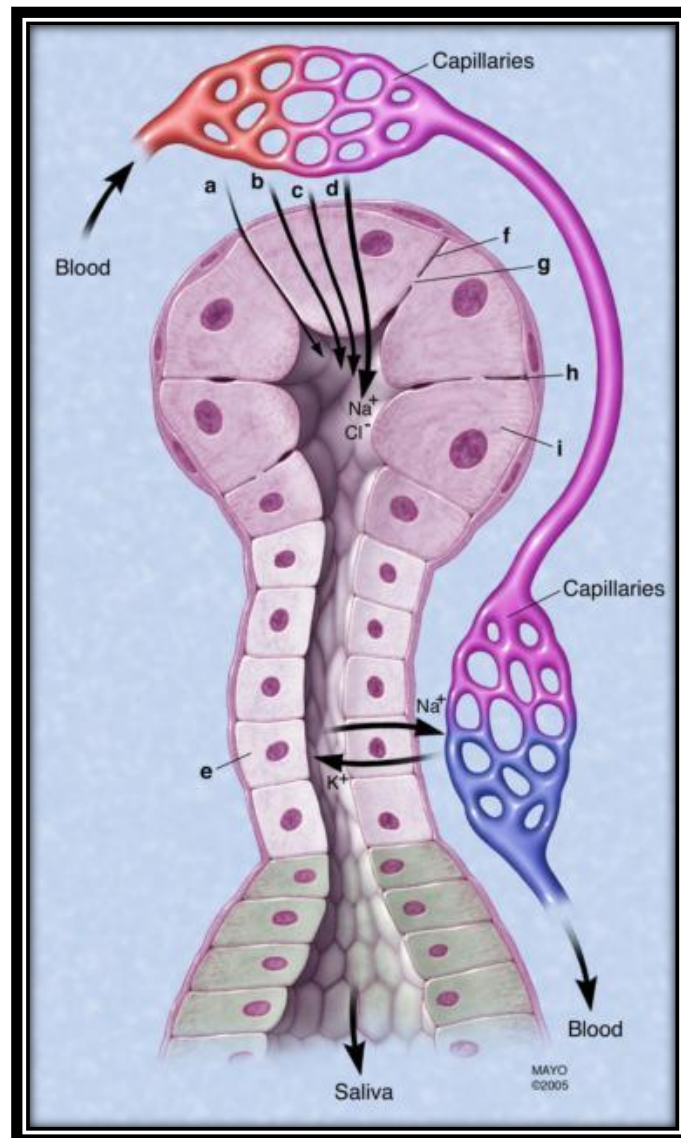
- **Transporte Ativo**

O transporte ativo ocorre a nível das células secretoras das glândulas salivares, é a segunda via de entrada de moléculas na saliva. Nesta via ocorre a passagem de várias proteínas tais como a proteína secretora de IgA e imunoglobulina, o que contribui para a resposta imunitária. A proteína secretora de IgA é sintetizada pelos linfócitos B localizados ao nível periférico do epitélio celular das células secretoras salivares, esta é transportada através de recetores de IgA presentes nas células acinares, e assim libertada na saliva. A sua secreção é aumentada pela estimulação das glândulas salivares pelo sistema nervoso sendo necessário haver um limite para o aumento da sua velocidade de transporte, uma vez que o fluxo de saliva estimulada diminui as concentrações de IgAs na saliva (Groschi, 2008; Macedo & Nunes, 2013; Ptaffe et al., 2011; Wang et al., 2013).

- **Ultrafiltração**

Uma terceira via de transporte de moléculas do sangue para a saliva é por ultrafiltração, um mecanismo extracelular onde ocorre a filtração por meio de lacunas e junções entre as células secretoras. Este tipo de transporte destina-se apenas a moléculas pequenas, ou seja, com peso molecular inferior a 1,9 kDa como a água, iões, catecolaminas e esteróides sendo as suas concentrações na saliva de 300 a 3000 vezes mais baixo do que no plasma (Nunes & Macedo, 2013; Ptaffe et al., 2011).

**Figura 2** - Mecanismo de transporte molecular do sangue para as glândulas



Adaptado de Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities, 2013.

A- Transporte Ativo, B- Difusão Passiva, C- Filtração Simples, D- Bombardeamento ativo de  $\text{Na}^+$  para dentro do ducto pelas células acinares, E- Bombardeamento de  $\text{Na}^+$  pelas células ductais de volta para o sangue, F- Membrana celular, G- Poro membranar, H- Espaço intracelular, I- Célula acinar.

Acrescenta-se ainda outra via pela qual as moléculas do sangue são transportadas pela saliva, a transudação. Através do fluido crevicular produzido pelo epitélio sucular da mucosa oral ou diretamente a partir da mucosa oral, os componentes do soro também chegam à saliva. A presença de algumas moléculas plasmáticas como no caso da albumina plasmática depende particularmente deste tipo de transporte (Ptaffe et al., 2011).



## Saliva Versus Sangue

A saliva é um fluido complexo que em comparação com o sangue, também contém uma variedade de enzimas, hormonas, anticorpos, constituintes antimicrobianos e citoquinas. Como referido anteriormente, muitos componentes encontrados no sangue são também encontradas na saliva devido às variadas formas de transporte como a difusão passiva, transporte ativo, ultrafiltração pelas glândulas salivares ou pelo sulco gengival (Spielmann & Wong, 2012).

Embora as células, os tecidos, fezes, urina e outras alternativas de diagnóstico sejam obtidas de forma rotineira, o sangue ou plasma continua a ser a fonte tradicionalmente mais frequente para obtenção de biomarcadores. No entanto, em muitos casos estes procedimentos de colheita de sangue pode ser economicamente desfavorável, problemático e traumático para os doentes (Yoshizawa et al., 2013; Zhang et al., 2014).

A saliva pode tornar-se um fluido altamente desejável se empregada como um meio para o desenvolvimento de biomarcadores com aplicações clínicas, desta forma, alivia o desconforto dos doentes através da disponibilização de um método não invasivo para a deteção de doenças (Anaya, 2013; Zhang et al., 2014).

Em comparação ao sangue, a saliva possui muitas vantagens, como as seguintes:

- 1) A saliva é facilmente coletada permitindo que o próprio paciente consiga fazer a sua colheita ou um indivíduo sem qualificação exigida como no caso da colheita de sangue que necessita de profissionais treinados e qualificados (Esser et al., 2008; Yoshizawa et al., 2013).
- 2) A colheita de sangue é um procedimento invasivo que causa dor ou algum desconforto aos doentes, sendo por vezes complicado quando é necessário lidar com indivíduos pouco colaborantes como no caso de pessoas com deficiências, crianças ou idosos, hemofílicos e recém-nascidos. O diagnóstico salivar é por isso considerado um método pouco invasivo permitindo superar estas desvantagens e possivelmente encorajar doentes a cumprir com a monitorização das suas doenças, uma vez que análises sanguíneas são muitas vezes requeridas várias vezes aos longo do tempo para

analisar a progressão de saúde e os seus resultados (Balan et al., 2014; Martí-álamo, Mancheño-franch, Marzal-gamarra, & Carlos-fabuel, 2012).

- 3) A colheita de amostras de saliva também confere segurança aos profissionais. No caso de indivíduos com hepatites e HIV a colheita de sangue torna-se mais arriscado enquanto que a colheita de saliva não coloca o profissional em risco devido a fatores existentes na saliva que inibem a infecção no caso do HIV (Esser et al.,2008; Yoshizawa et al., 2013).
- 4) A saliva possui a vantagem de não formar coágulos o que torna o seu armazenamento e transporte mais fácil em comparação ao sangue (Segal & Wong, 2008).
- 5) Uma vez que a saliva é facilmente coletada, armazenada e transportada conseqüentemente torna-se um diagnóstico mais barato em comparação ao sangue. Sendo mais económico tanto para os doentes como para os prestadores de saúde (Yoshizawa et al., 2013).
- 6) Muitas vezes as análises ao sangue são dificilmente obtidas por questões éticas e culturais, neste caso com o uso da saliva como diagnóstico a aprovação para a sua obtenção é mais facilmente conseguida (Malon, Sadir, Balakrishnan, & Córcoles, 2014).

Apesar das vantagens mencionadas, segundo os autores Yoshizawa et al. (2013), ainda são necessários mais estudos para comprovar o valor do diagnóstico salivar e potenciais biomarcadores, pois apesar de haver constituintes do sangue presentes na saliva, estes estão em baixa concentração. No entanto, segundo os autores Segal e Wong (2009) esta limitação é superada com o desenvolvimento de novas tecnologias.

Porém a ideia da saliva se tornar um diagnóstico alternativo ao sangue deve ser explorada pois existe uma correlação entre a saliva e os constituintes do sangue que permite uma possível ligação a nível molecular (Yoshizawa et al.,2013).

## Colheita Salivar

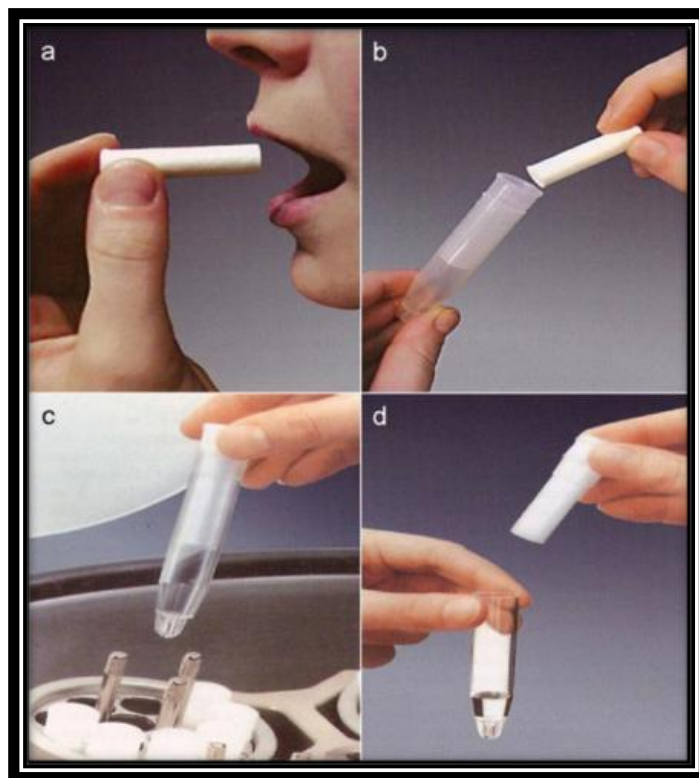
Os componentes encontrados na saliva podem fornecer informações relevantes para o diagnóstico clínico. Permitem uma colheita não invasiva, sem provocar ansiedade aos doentes permitindo múltiplas colheitas se necessário. Apesar da colheita salivar ser um procedimento facilmente executado, é necessário ter em conta varias particularidades que diferem entre indivíduos: o seu ritmo circadiano, o tipo de glândula salivar, os níveis de fluxo salivar, a idade do paciente, tipo de estimulação salivar, dieta, estado fisiológico e método de colheita. Estas particularidades fazem com que os constituintes salivares variem entre si. Desta forma, para a realização da colheita é importante que o paciente seja informado sobre o protocolo de colheita, ou seja, da importância do tempo preciso para a colheita da amostra salivar, informar que antes da colheita não pode escovar os dentes e deve evitar a ingestão de alimentos ou pastilhas elásticas durante 30 minutos e por fim bochechar com água para evitar contaminação da saliva (Chiappin, Antonelli, Gatti, & Palo, 2007; Pfafe et al., 2011; Yoshizawa et al., 2013).

A saliva total é mais utilizada para as colheitas salivares devido ao facto de ser mais facilmente obtida sem a necessidade de equipamento especializado. No caso da saliva específica a sua colheita é obtida através da sucção ou por canalização dos ductos salivares ou através de aparelhos muito específicos para atingir as áreas afetadas. Estes procedimentos são mais complexos, invasivos, lentos e requer uma pessoa especializada para a sua realização. Devido a estas inconveniências, são muito pouco utilizados, desta forma. A saliva total é considerada mais prática para a colheita salivar sendo a mais frequentemente utilizada (Chiappin et al., 2007; Pfafe et al., 2011).

A saliva total permite obter as amostras salivares através de dois métodos: por estimulação salivar ou sem estimulação salivar. A saliva estimulada é obtida por movimentos mastigatórios ou pelo uso de ácido cítrico. No caso dos movimentos mastigatórios, ao paciente é pedido para mastigar uma pastilha elástica ou parafina de forma a aumentar o fluxo salivar. No caso do uso de ácido cítrico, ocorre a estimulação salivar através da colocação de uma gota (0,1-0,2 mol/L) na língua o que provoca uma secreção máxima de 5-10mL/min. No entanto o uso de ácido cítrico interfere nas análises dos imunoenaios através da diminuição do pH (<3.0) e também nas análises de alguns analitos como por exemplo o testosterona (Lee & Wong, 2010; Pfafe et al., 2011).

O método por estimulação geralmente é utilizado quando há dificuldade por parte dos doentes em produzir saliva suficiente, pois para além de afetar os níveis de pH, afeta também a quantidade necessária. Por outro lado, no caso da saliva não estimulada, não intervém nenhum método para a sua estimulação o que evidencia um fluxo salivar dependente do grau de hidratação dos indivíduos. A colheita é obtida através de 3 métodos: cuspir para dentro de um tubo de colheita, a sucção, a drenagem/ “drooling” ou através do uso de uma compressa ou algodão absorvente onde o conteúdo e depois extraído por centrifugação (figura 3) (Lee & Wong, 2010).

**Figura 3-** Colheita de saliva total pelo método de centrifugação



Adaptado por Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases, 2010

A-Mastigação do algodão para a colheita salivar, B- Colocação do algodão com saliva no tubo, C- Centrifugação, D- Separação da saliva do algodão para análise

No caso dos idosos, cuspir para um tubo é considerado uma barreira social e a presença de xerostomia dificulta a utilização deste método por parte dos doentes (Groschi, 2008; Chappin et al., 2007; Ptaffe et al., 2011; Yoshizawa et al., 2013; Lee & Wong, 2009).

Durante o procedimento da colheita salivar, pode ocorrer a absorção ou modificação desta, havendo alterações salivares e consequentemente falsos resultados.

Temos o caso do uso de parafina, algodão ou compressas que muitas vezes resultam na diminuição do conteúdo salivar devido a absorção de moléculas salivares pertinentes para o diagnóstico. Atualmente existem companhias que fornecem uma variedade de aparelhos que se destinam ao diagnóstico e a colheita salivar. Alguns destes dispositivos encontram-se na tabela seguinte.

**Tabela 1-** Aparelhos comuns para o diagnóstico salivar

<b>Companhia</b>	<b>Aparelho</b>
<b>Salimetrics</b>	Saliva collection aid
	Salimetrics oral swab
	Salimetrics children´s swab
	Salimetrics infants´s sab
<b>Oasis Diagnostics</b>	DNA.SAL
	UltraSal-2
	Super.SAL
<b>Malvern Medical Developments</b>	Oracol
<b>DNA Genotek</b>	ORAc collect DNA
	Oragene DNA
	Oragene RNA
<b>Immalysis</b>	Quantisal
<b>Norgen</b>	Saliva DNA collection and preservation device
<b>Biomatrix</b>	DNAgard

Adaptado de Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities, 2013.

## **Diagnóstico Salivar**

O diagnóstico salivar geralmente é realizado quando existe alguma suspeita de cancro oral, alguma doença infecciosa, sendo maioritariamente utilizada em medicina dentária para a determinação do risco de cáries através da avaliação de capacidade tampão e bactérias, doenças sistémicas que envolvem as glândulas salivares como a Síndrome de Sjogren e Síndrome Bechet e ainda no caso da doença periodontal. Atualmente, tem havido grande interesse pelo diagnóstico salivar para a deteção de doenças sistémicas e monitorização das mesmas de forma a levar este meio de diagnóstico a outro nível. Devido às formas de transporte dos constituintes do sangue para a saliva e a possível obtenção de informação devido a esta passagem de componentes sanguíneos para a saliva o que poderá um dia substituir outras formas de diagnóstico invasivo tornando-se mais confortável e facilmente exequível tanto para os profissionais de saúde como para os doentes pediátricos ou geriátricos (Chiappin et al., 2007; Malamud & Rodriguez-Chavez, 2011;).

É de salientar que apesar da saliva ter potencial para o meio de diagnóstico, ainda não está estabelecido como um método analítico devido a falta de informação relativamente a composição bioquímica da saliva e a sua correlação com níveis plasmáticos. Muitos componentes salivares como sódio, potássio, imunoglobulina A e amilase encontram-se em maiores concentrações à medida que a idade dos indivíduos avançam. No caso de crianças também existem evidências de alterações na atividade da amilase salivar. Porém, em adultos saudáveis não existem alterações significativas das concentrações salivares. No entanto, apesar de ainda necessitar de mais estudos para comprovar a saliva como meio de diagnóstico, tem havido interesse e estudos recentes que demonstram a sua utilidade para doenças cardiovasculares, sistémicas e inflamatórias (Desai & Mathews, 2014).

Atualmente a saliva é usada em varias áreas de toxicologia, de endocrinologia, ciências forenses, com métodos e utensílios de diagnóstico bem estabelecidos como no caso da deteção de drogas e HIV. Podemos exemplificar, no caso do HIV, a deteção de anticorpos contra HIV-1 e HIV-2, devido à atual aprovação do “*OraQuick*” pelo FDA, um dispositivo que permite ser utilizado pelo próprio em qualquer lugar, torna possível a deteção do HIV em várias comunidades como em centros de saúde, salas de emergência e ainda em consultórios dentários. Este dispositivo permite a identificação

dos anticorpos contra o HIV de forma rápida através de uma simples amostra de saliva (Desai & Mathews, 2014; Malamud & Rodriguez-Chavez 2011).

A tabela seguinte, sumariza alguns dispositivos a serem utilizados nas áreas referidas.

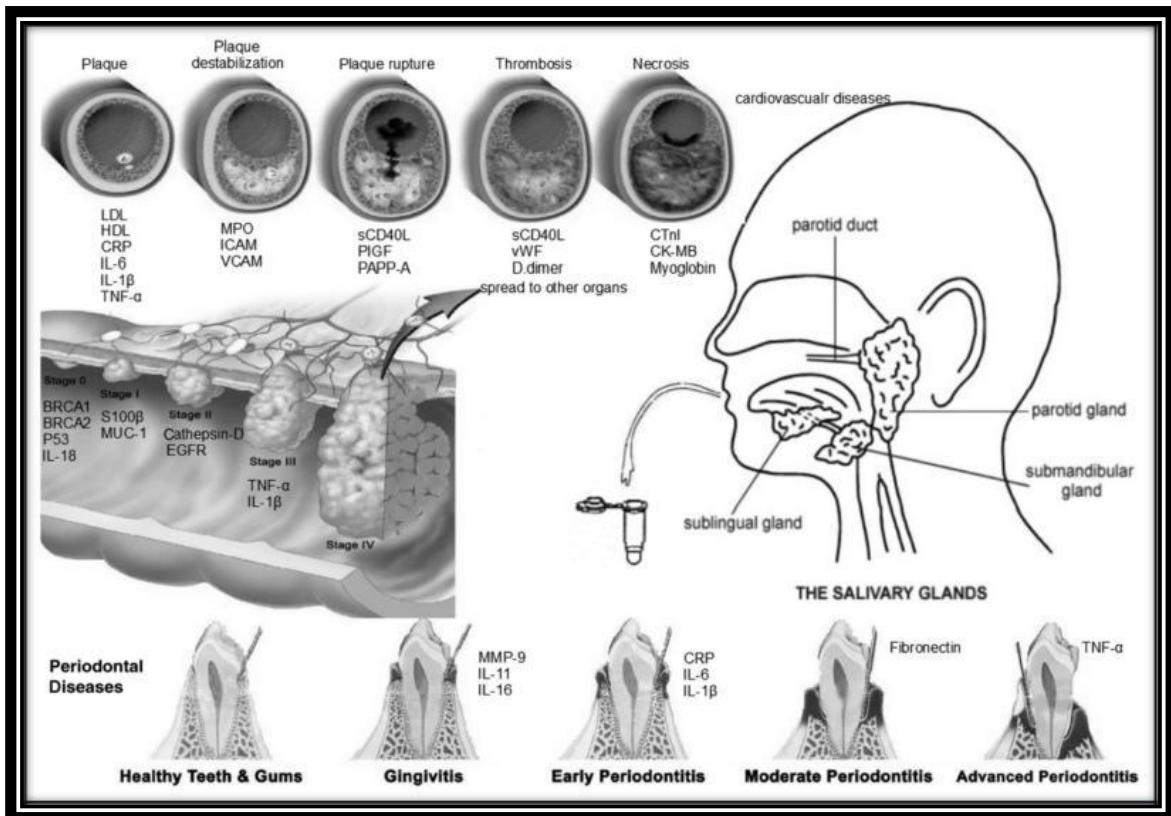
**Tabela 2** - Produtos comerciais disponíveis nos EUA para o diagnóstico Salivar

Objetivo do teste	Marcadores	Nome do Produto
<b>Abuso de drogas</b>	NIDA 5 Blood panel + barbitúricos, metanfetaminas, benzodiazepinas, metadona	Intercept
<b>Abuso de drogas</b>	NIDA 5 Blood panel	SALIVASCREEN 5 professional
<b>Álcool e Sangue</b>	Etanol	Q.E.D. Saliva Alcohol test
<b>HIV</b>	HIV antibody	OraQuick ADVANCE Rapid HIV-1/2 Antibody test
<b>Seguros &amp; toxicologia</b>	Metabolito da cocaína, cotinina, canabinóides, opiáceos, fenciclidina	MICRO-PLATE EIA
<b>Hormonas</b>	Estradiol, progesterona, testosterona, DHEA, cortisol	ZRT Saliva Test

Adaptado de Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases, 2010

Com a descoberta de biomarcadores na saliva é possível monitorizar a saúde e identificar doenças num estado mais precoce. Estes biomarcadores podem ser definidos como moléculas, alterações genéticas, células, ou seja, podem ser DNA; RNA ou outras moléculas proteicas, dos quais podem ser reconhecidos pelo seu processo biológico normal ou anormal podendo refletir diferentes estádios de doença. Podem ser identificados e quantificados em tecidos, células ou fluidos, como no caso da saliva. Um biomarcador pode ser um elemento secretado devido a alterações na sequência de genes ou na sua expressão tornando possível a determinação de prognósticos e monitorização como no caso do cancro. No caso de inflamações sistémicas, existe um aumento de biomarcadores na cavidade oral (figura 4) (Goswami, Mishra, Agrawal, & Agrawal, 2015; Ptaffe et.,2011).

**Figura 4-** Biomarcadores com concentração aumentada na saliva durante a inflamação local e sistêmica



Adaptado por Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications, 2011

Biomarcadores encontrados em concentrações elevadas durante a doença periodontal e a doença cardiovascular estão representados: MPO, mieloperoxidase ; ICAM, molécula de adesão intercelular;

VCAM , molécula de adesão celular vascular ; sCD40L, ligando de CD40 solúvel; PIGF, fator de crescimento placentário; PAPP- A, gravidez associada à proteína plasmática- A; vWF , von Willebrand fator ; CK- MB , creatina quinase isoenzima músculo - cérebro; BRCA , cancro da mama; S100, S100 proteína de ligação de cálcio; MUC , mucina ; EGFR , recetor fator de crescimento epidérmico; MMP, metaloproteinase de matriz.

O diagnóstico da saliva total confere constituintes do soro, motivo pelo qual é mais frequentemente utilizado para o diagnóstico de doenças sistémicas e devido ao facto de ser facilmente coletada, não invasivo, sem necessidade de equipamento especializado. Permite que a sua colheita seja de forma estimulada ou não estimulada o que será abordado mais à frente. Algumas glândulas salivares são diretamente ou indiretamente afetadas por doenças sistémicas influenciando a quantidade e composição salivar. Proteínas possuem o seu valor no diagnóstico salivar e também os componentes genómicos. Ou seja, para que a saliva como meio de diagnóstico seja aprovada para diagnóstico clínico, necessita de maior especificidade a nível dos biomarcadores



presentes na saliva. Não é suficiente a existência de apenas um biomarcador mas sim uma combinação de biomarcadores para melhorar e aumentar a informação necessária para um correto diagnóstico. Desta forma surge uma das desvantagens da saliva como diagnóstico, a quantidade de analitos presentes não são suficientes, no entanto existem autores que defendem que as novas tecnologias e o desenvolvimento de novas técnicas, torna possível ultrapassar esta desvantagem (Arunkumar, Arunkumar, Burde, & Shakunthala, 2014; Lee & Wong, 2009; Miller et al., 2010; Ptaffe et al, 2011; Wong, Melvin, Baum & Yates III, 2011).

## **Potencias biomarcadores salivares**

### **Doenças Sistémicas**

#### **1. Oncologia**

No cancro ocorrem várias alterações moleculares. Torna-se cada vez mais imprescindível o diagnóstico precoce de forma a realizar tratamentos de prevenção eficazes e com sucesso. Atualmente os biomarcadores salivares ainda não se encontram clinicamente validados para diferentes tipos de cancro como o cancro da mama, cancro dos pulmões, cancro oral como o carcinoma de células escamosas e cancro do estômago. No entanto, estes biomarcadores tem vindo a ser encontrados na saliva havendo proteínas expressas em concentrações diferentes entre doentes com cancro ou sem cancro (Greabu et al., 2009; Martí-álamo et al., 2012;; Spielmann & Wong, 2012).

##### **1.1. Cancro da Mama**

O primeiro biomarcador salivar a ser descoberto para o cancro foi o recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) do cancro da mama (Martí-álamo et al., 2012). Segundo Ptaffe et al. (2011) a ação sobre este recetor tem vindo a ser eficaz no tratamento de estádios avançados de cancro da mama com uma sobreexpressão desta biomolécula, em grupos pequenos de doentes o que revolucionou o tratamento desta patologia. Este recetor é encontrado também na saliva, no entanto segundo um estudo realizado por Laidi et al. (2014) não houve diferenças significativas na concentração da proteína salivar HER-2 no grupo dos doentes com HER-2 positivo e negativo concluindo que este recetor poderá não ser uma alternativa fiável ao diagnóstico. Segundo Ptaffe et al. (2013) pode ser utilizado como um complemento ao diagnóstico com o objetivo de examinar e determinar a eficiência do tratamento do cancro da mama referindo que os testes salivares não devem substituir alguns exames como a mamografia e exames mamários realizados pelos profissionais.

Outro marcador de cancro da mama, o antigénio CA 15-3, é um marcador tumoral localizada nas células cancerosas que entra na corrente sanguínea sendo também descoberto na saliva. É utilizado no diagnóstico de estádios avançados de cancro da mama. O marcador tumoral c-erbB2 é o recetor da tirosina kinase que geralmente se encontra sobre expressa em doentes com cancro da mama e tumores a nível dos ovários, ele representa 25% dos marcadores do cancro respetivos. Estes dois marcadores, CA 15-3 e c-erbB2 foram encontrados com níveis muito elevados na saliva em mulheres com cancro da mama, em comparação com mulheres saudáveis. Acrescenta-se ainda que o c-erbB2 foi detetado com grandes percentagens de especificidade de diagnóstico, 70% a 80% e de sensibilidade de diagnóstico de 78% a 93% (Castagnola et al., 2011; Deepa. & Thirrunavukkarasu, 2010; Greabu et al.,2009; Martí-álamo et al., 2012; Mathali et al., 2014)

Relativamente ao marcador CA 15-3 segundo Martí-Álamo et. al (2012) houve estudos que descobriram níveis muito elevados deste marcador em doentes com cancro da mama que não foram tratados, havendo também fortes correlações deste marcador entre a saliva e o soro. Num estudo recente realizado por Laidi et al. (2014) foi também observada uma correlação positiva elevada entre as concentrações deste marcador na saliva e soro, no entanto, não houve nenhuma diferença significativa em termos de concentração deste marcador na saliva e soro em mulheres saudáveis e doentes com cancro da mama. No estudo deste autor salienta-se ainda que não foram encontrados dados que revelem diferenças significativas no diagnóstico precoce do cancro da mama.

O marcador CA-125 é outro marcador para o cancro epitelial dos ovários, cancro da mama e também cancro oral existindo concentrações elevadas na saliva e soro em doentes com este tipo de cancros com correlações positivas entre a saliva o soro (Deepa.T & Thirrunavukkarasu.N,2010; Greabu et al., 2009; Malathi et al., 2014; Martí-Álamo et al., 2012;).

## **2. Doenças Cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares são consideradas uma das principais causas de morte a nível mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano 2008, por volta dos 30% dos 57 milhões de mortes no mundo foi devido às doenças cardiovasculares como a hipertensão, doença arterial e acidente vascular cerebral. Considera-se que esta patologia é causada por fatores multifatoriais e os seus fatores de risco são conhecidos, como o tabaco, ingestão de álcool, a falta de exercício físico e elevados níveis de colesterol no sangue (Zheng et al., 2014).

Com a descoberta de biomarcadores envolvidos na patogénese da doença vascular poderá tornar possível a deteção precoce desta patologia e contribuir para melhorar os conhecimentos acerca desta doença. Para muitos investigadores, o uso de fluidos orais é um campo de grande interesse uma vez que os biomarcadores encontrados no sangue associados à inflamação, à aterosclerose e às lesões do miocárdio, já são conhecidos e foram também descobertos na saliva (Foley et al., 2012; Zheng et al., 2014).

A enzima alfa-amilase tem sido utilizada como um biomarcador salivar no follow up pós-operatório de doentes que foram submetidos a cirurgias cardiovasculares. A sua baixa concentração na saliva em doentes com aneurisma aórtico está associada ao aumento da taxa de mortalidade (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Greabu et al., 2009).

A proteína lisozima, é derivado de neutrófilos e secretada na saliva. É considerada um biomarcador para infeções orais e hiperglicemia. Este biomarcador salivar encontra-se em elevadas concentrações e tem vindo a demonstrar uma forte associação com a hipertensão. Num estudo realizado por Qvarnstrom et al. (2010) a lisozima revelou uma associação significativa com a hipertensão, uma fase inicial da doenças cardiovascular, o que poderia nos indicar que a disfunção endotelial que ocorre devido às infeções crónicas e o metabolismo da glicose, podem estar envolvidas na etiologia da hipertensão (Malamud & Rodriguez-Chaves, 2012; Qvarnstrom et al., 2010).

A síndrome Coronária Aguda (SCA) abrange patologias cardíacas resultantes da rutura de placas ateroscleróticas com formação de trombos que poderá levar a uma obstrução parcial ou total de uma artéria coronária. Esta patologia apresenta sintomas desde a dor précordial e em caso de obstrução total de uma artéria coronária, o infarto agudo do miocárdio (IAM). A síndrome Coronária Aguda engloba IAM com supra

desnívelamento do segmento ST, IAM sem supra desnívelamento do segmento ST ou angina instável (Pesaro, Campos, Katz, Corrêa, & Knobel, 2008; Malathi et al., 2014; Piérard, 2007). O diagnóstico para IAM é atualmente baseado em manifestações clínicas e alterações eletrocardiográficas e biomarcadores sanguíneos o que permite a identificação de doentes com as patologias cardíacas mencionadas. O uso de biomarcadores salivares para a doença cardiovascular em associação com o eletrocardiograma revela correlações positivas nos doentes com enfarte de miocárdio, quando comparado a doentes saudáveis. Estes biomarcadores salivares são os seguintes; proteína C reactiva (PCR), mioglobina (MYO), creatina quinase-MB (CK-MB), troponinas cardíacas (cTn) e mieloperoxidase.

Segundo um estudo realizado por Miller et al. 2010 foi possível determinar se a presença das enzimas cardíacas, creatina quinase-MB, troponinas cardíacas e mioglobina eram elevadas ou não na saliva de doentes com enfarte de miocárdio agudo. Determinou-se que os valores salivares de mioglobina eram elevados nas primeiras 24 horas de dor précordeal em doentes com infarto de miocárdio agudo em comparação aos doentes sem patologias cardíacas, relevando também uma correlação positiva com o soro. No entanto, as enzimas troponina e creatina quinase-MB, biomarcadores eficazes no diagnóstico sanguíneo de IAM não relevaram grande valor de diagnóstico como biomarcador salivar.

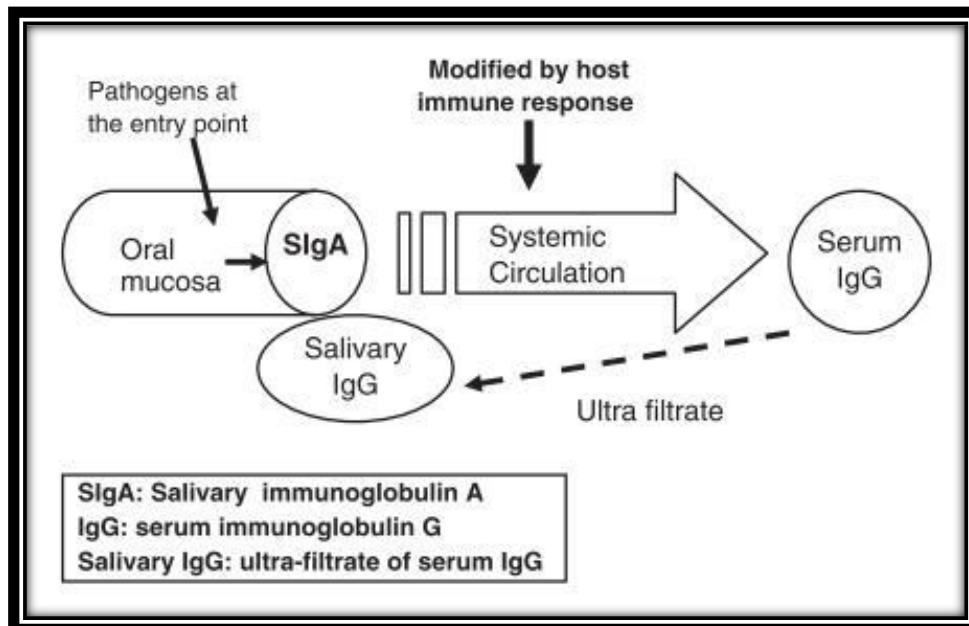
Miller et al (2010) também estudou os marcadores inflamatórios na saliva como a proteína C reativa, um importante marcador libertado pelo fígado durante processos inflamatórios ocorridos por aterosclerose e as suas complicações, a TNF- $\alpha$ , as metaloproteinases que são libertadas pelos macrófagos devido às lesões ateroscleróticas presentes na síndrome coronária aguda, e a mieloperoxidase que é expressa pelos neutrófilos no caso de lesões tecidulares que reporta níveis elevados no sangue em doentes com SCA. Na saliva, os marcadores inflamatórios, TNF- $\alpha$ , PCR e MMP-9, revelaram concentrações elevadas em doentes com IAM. As suas concentrações salivares apresentaram correlações positivas com as concentrações encontradas no sangue. A mieloperoxidase também apresentou concentrações elevadas na saliva. No entanto segundo Ptaffe et al. (2011) apesar da presença de PCR na saliva as suas correlações com o sangue ainda necessita de mais investigação e a presença desta molécula na saliva necessita do uso de tecnologias para a sua deteção por existir em baixa concentração na saliva.

A rutura das placas ateroscleróticas leva à libertação de moléculas adesivas, CD40 solúvel que em estudos confirmou a sua baixa concentração em doentes com IAM e elevadas concentrações de ICAM-1 na saliva (Malathi et al., 2014; Miller et al., 2010).

Uma vez que as alterações inflamatórias ocorrem durante a aterosclerose, as infeções extravasculares, a resposta do sistema imunitário e a inflamação, poderão desempenhar um papel importante para compreensão desta patologia. Níveis salivares de imunoglobulinas segundo Malamud e Rodriguez-Chavez (2012) encontram-se em concentrações altas na existência de doença da artéria coronária, no entanto, a concentração de IgA é controversa uma vez que também aumenta em resposta a outras doenças sistémicas.

Num estudo realizado por Janket et al. (2010), os doentes com e sem doença da artéria coronária confirmaram que a IgA tem uma correlação positiva com esta patologia enquanto que IgG era inversamente correlacionada. O que poderia explicar esta associação inversa entre IgG salivar e a doença da artéria coronária é o facto desta imunoglobulina não indicar com precisão a infeção, uma vez que corresponde a um ultrafiltrado do sangue que sofre modificações pelo sistema imunológico do hospedeiro (figura 5).

**Figura 5-** Diagrama esquemático do mecanismo ocorrido no IgA e IgG



Adaptado de Salivary immunoglobulins and prevalent coronary artery disease, 2010

Numa investigação realizado por Zheng et al. (2014), foi realizado um estudo para identificar as proteínas ou péptidos em doentes com apneia obstrutiva do sono (AOS) e doença cardiovascular uma vez que existe uma correlação entre estas duas patologias. A apneia obstrutiva do sono caracteriza-se pela repetição parcial ou total da obstrução da via aérea durante o sono. Existem grandes possibilidades de doentes que sofrem de apneia obstrutiva do sono correrem o risco de desenvolver desordens no sistema cardiovascular revelando uma incidência maior de desenvolverem patologias vasculares do que a população em geral.

Atualmente são conhecidas as causas para o desenvolvimento destas duas patologias. A obesidade é uma das causas que partilham, no entanto, o motivo da disfunção cardíaca em doentes com apneia obstrutiva do sono ainda não está totalmente compreendida. Com a identificação de potenciais biomarcadores envolvidas na patogénese das doenças vasculares de doentes com apneia obstrutiva do sono, poderá auxiliar no diagnóstico precoce e também na compreensão desta patologia (Zheng et al., 2014).

No estudo realizado por Zheng et al. (2014) foi utilizada uma amostra de 38 doentes com apneia obstrutiva do sono e foram divididos em dois grupos: um grupo com doença cardiovascular e outro grupo sem doença cardiovascular. Foi descoberto o biomarcador  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína (AHGS) em concentrações baixas no grupo de doentes com doença cardiovascular em comparação ao grupo de doentes sem doença cardiovascular. O biomarcador AHGS é conhecido como uma proteína que é sintetizada nomeadamente pelo fígado e secretada na circulação do fluido corporal apresentando-se em níveis baixos quando existem inflamações agudas o que indica que este biomarcador poderá ter um papel importante no sistema cardiovascular. No entanto o papel de AHSG em doentes com doenças cardiovascular e com AOS continua a ser uma questão controversa. São necessárias amostras maiores e mais estudos para validar o diagnóstico salivar.

### **3. Diabetes**

A diabetes mellitus é uma doença crônica do metabolismo de hidratos de carbono caracterizada pela deficiência de insulina, resistência celular à ação da insulina ou ambos os processos, resultando em hiperglicemia, glicosúria e outras patologias relacionadas. A diabetes mellitus caracteriza-se pelo desequilíbrio entre o consumo de glicose pelos tecidos e a sua libertação pelo fígado. Esta doença tem repercussões na qualidade de vida dos doentes um vez que se associa a varias complicações nos órgãos, nos olhos, nos rins, coração e vasos sanguíneos (Abikshyeet, Ramesh, & Oza, 2012; Satish et al., 2014).

A diabetes mellitus afeta muitas pessoas a nível mundial, sendo cada vez maior o numero de pessoas afetadas com esta doença. Para o diagnóstico, são realizadas medições dos níveis de glicose no sangue, no entanto, atualmente segundo Abikshyeet et. al (2012), tem vindo a tornar-se cada vez mais comum a avaliação dos níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c) o que permite o controlo dos níveis glicémicos a longo prazo.

Os diabéticos necessitam de um controle rigoroso dos níveis de glicose. Este controle é feito através de punções venosas para monitorizar a glicose no sangue levando a que muitos doentes tenham um acompanhamento ineficaz devido a este tipo de monitorização que é invasiva e desconfortável. Desta forma, tem vindo a ser estudado os níveis de glicose através da saliva uma vez que esta é encontrada na saliva e também a hemoglobina glicosilada que tem vindo a ser cada vez mais investigada para o controle dos níveis glicémicos. Alguns autores defendem que a glicose por ser uma molécula de pequenas dimensões consegue passar para a saliva através da membrana semipermeável sendo detetável na saliva especialmente quando existe níveis elevados de glicose no sangue. Segundo alguns autores é também possível a deteção de glicose em indivíduos diabéticos pois podem ocorrer alterações na membrana basal das glândulas salivares destes indivíduos o que promove o aumento de transporte da molécula glicose para a saliva. Alguns estudos reportam que os níveis de glicose refletem níveis parecidos a glicose do sangue o que poderá validar a saliva como um meio de diagnóstico para a diabetes, embora ainda sejam necessários mais estudos (Balan et al., 2014; Satish et al.,2014).



No ano de 2014 foi realizado um estudo por Satish et al. (2014) com o objetivo de determinar se existe correlação entre os níveis de glicose na saliva e no sangue de doentes diabéticos tipo II e de doentes saudáveis não diabéticos de forma a determinar a eficácia da saliva como meio de diagnóstico. A amostra consistia em 30 indivíduos dos quais 20 eram doentes diabéticos e 10 eram doentes saudáveis não diabéticos.

O estudo revelou uma correlação significativa entre as concentrações de hemoglobina glicosilada e as concentrações de glicose no sangue em ambos os grupos, havendo concentrações mais elevadas de glicose no grupo dos não diabéticos, e concentrações normais de glicose no grupo dos não diabéticos (Satish et al., 2014).

A nível das concentrações de hemoglobina glicosilada e glicose salivar e as concentrações das mesmas no sangue, demonstraram uma correlação significativa. Esta correlação suporta o uso da saliva como meio de diagnóstico para a diabetes tipo II. No entanto, serão necessários mais estudos com uma amostra maior para comprovar a saliva como meio de diagnóstico para a diabetes (Satish et al., 2014).

No ano 2014 foi realizado outro estudo por Balan et. al com o objetivo de comparar a análise da concentração salivar e a concentração de glicose no sangue em doentes com diabetes tipo II.

Neste estudo foi possível detetar glicose na saliva de doentes diabéticos e não diabéticos. Os níveis de glicose salivar foram significativamente maiores em diabéticos do que em não diabéticos, havendo também uma correlação excelente entre as concentrações de glicose salivar e glicose sanguíneo de doentes diabéticos.

Este autor defende o facto dos níveis de glicose serem elevados na saliva se deve à passagem desta molécula pela membrana basal quando existe glicose em concentrações elevadas no sangue, e afirma ainda que o efeito das alterações na membrana basal de diabéticos também leva ao aumento de glicose na saliva com consequente alteração na composição salivar dos diabéticos. É importante salientar que a hiperglicémia não influencia diretamente os níveis de glicose salivar, ela provoca alterações na membrana basal das glândulas salivares e leva a alterações microvasculares nos vasos sanguíneos o que torna duvidoso a relação de glicose salivar e glicose sanguíneo, uma vez que os níveis de glicose salivar depende do grau dos danos ocorridos nas glândulas salivares e o nível de controlo metabólico que influencia esta relação (Balan et al., 2014).

Este autor referencia que a saliva através do estudo realizado poderá fornecer uma nova perspectiva para investigações futuras, no entanto, são necessários mais estudos para evidenciar o seu uso como meio de diagnóstico (Balan et al., 2014).

Em 2012, Abikshyeet et al. desenvolveu um estudo com o objetivo de encontrar um marcador para o diagnóstico da diabetes e a sua monitorização através da comparação de amostras salivares e sanguíneas com glicose e hemoglobina glicosilada (HbA1c) em doentes saudáveis e doentes diabéticos.

Este estudo foi realizado numa população de 106 doentes diagnosticados com diabetes tipo II e de 15 doentes saudáveis, grupo controlo (Abikshyeet et al., 2012).

O estudo revelou que as concentrações de glicose salivar em jejum eram elevadas nos doentes diabéticos em comparação ao grupo controlo e com diferenças significativamente altas. As correlações entre a glicose salivar e sanguínea foi positiva e significativa tanto nos doentes diabéticos como nos doentes saudáveis (Abikshyeet et al., 2012).

Foram também encontradas correlações positivas e com níveis significativas entre a percentagem de hemoglobina glicosilada e a concentração de glicose salivar nos doentes diabéticos (Abikshyeet et al., 2012).

Foi possível observar que havia um aumento de glicose salivar à medida que aumentava as percentagens de hemoglobina glicosilada e os níveis de glicose no sangue. Assim, através destes resultados, é possível deduzir que um pobre controlo dos níveis de glicémia corresponde a um aumento dos níveis de glicose salivar (Abikshyeet et al., 2012).

Este autor também defende que as complicações a nível microvascular e as alterações na membrana basal das glândulas salivares nos diabéticos, leva ao aumento de glicose na saliva (Abikshyeet et al., 2012).

Com este estudo foi possível comprovar e concluir que os níveis de glicose salivar em jejum poderão ser utilizados como meio de diagnóstico não invasivo com vantagem de monitorizar os níveis glicémicos de doentes com diabetes mellitus, no entanto, continua a ser necessário mais estudos com populações maiores em localizações geográficas diferentes para que a saliva possa ser utilizada como meio de diagnóstico para a diabetes mellitus seja estabelecida como tal e com possível monitorização desta patologia (Abikshyeet et al., 2012). Pois segundo o autor Malamud e Rodriguez-Chaves (2012) há estudos com resultados controversos como no caso da glicose salivar não demonstrar correlações positivas com a glicose sanguínea.

Para além dos estudos realizados relativamente aos níveis de glicose salivar e de hemoglobina glicosilada, foram também realizados estudos a nível da insulina salivar a diabetes tipo I (Desai & Mathews, 2014; Malamud & Rodriguez-Chaves, 2012).

A insulina salivar foi detetada em doentes com diabetes tipo I revelando correlações positivas com a insulina encontrada no sangue. No entanto, tem havido discrepâncias e valores controversos entre os tempos e magnitude a nível das alterações da insulina que levou a que muitos autores não recomendassem as concentrações da insulina como marcador (Desai & Mathews, 2014).

Foram realizados mais estudos para a insulina salivar em que num desses estudos foram demonstradas concentrações de insulina salivar 10 vezes mais baixas em comparação aos níveis das concentrações de insulina no sangue. Este estudo revelou alterações significativas entre as concentrações de insulina salivar e insulina sanguínea demonstrando que a insulina poderá ser um meio de diagnóstico mas ainda serão necessários muitos estudos para validar a diagnóstico salivar da insulina (Desai & Mathews, 2014).

## **4. Doenças Autoimunes**

### **4.1. Síndrome Sjogren**

As doenças autoimunes apresentam um diagnóstico complexo e são associadas a etiologias pouco claras. Doenças autoimunes como a síndrome de Sjogren, lúpus eritematoso e esclerose sistêmica encontram-se associadas a doenças reumatóides e são responsáveis pela produção de auto anticorpos que atacam os tecidos saudáveis do corpo humano (Malamud & Rodriguez-Chavez, 2012).

A síndrome de Sjogren (SSJ) é uma doença autoimune crônica caracterizada pela secura da boca, xerostomia, e olhos, ceratoconjuntivite seca, através da destruição das glândulas exócrinas pelas células do sistema imunitário levando também a infiltração linfocitária das mesmas (Ching et al., 2011).

Esta síndrome pode ser classificada em primária e secundária. A Síndrome de Sjogren primária (pSS), é considerada a terceira doença autoimune mais comum que afeta maioritariamente as mulheres na 4<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> década de vida com uma prevalência de 0,5%. Esta síndrome caracteriza-se como uma doença isolada, ausente de outras desordens autoimunes do tecido conjuntivo, afetando principalmente as glândulas lacrimais e salivares, resultando na diminuição da secreção destas glândulas. Em contraste, a Síndrome de Sjogren secundária, apresenta-se associado a desordens autoimunes ou do tecido conjuntivo, como a Artrite Reumatoide ou Lúpus Eritematoso sistêmico (LES) (Ching et al., 2011; Patel & Shahane, 2014; Pink et al., 2009).

O diagnóstico da Síndrome de Sjogren é baseada em vários procedimentos, uma biópsia das glândulas salivares minor do lábio demonstrando o infiltrado linfocitário, a detecção sanguínea dos auto anticorpos, clínica da sintomatologia, sialometria para a medição da produção da secreção salivar e avaliações sialoquímicas. No entanto, estes testes são caros e invasivos e nem sempre conclusivos uma vez que a sintomatologia é variada e os biomarcadores laboratoriais são pouco sensíveis e específicos, o que torna o diagnóstico desta síndrome complicado e problemático (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Pink et., 2009).

Porém, apesar da necessidade de mais estudos para a validação dos biomarcadores salivares, muitas investigações tem vindo a mostrar concentrações salivares elevadas consistentemente de sódio, cloreto, imunoglobulinas como a IgA e IgG e mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2, a albumina e citocinas Il-2 e IL-6, lactoferrina,

microglobulina  $\beta_2$ , lisozima C e cistatina C em doentes com SSJ. Foram também observados em doentes com SJJ, concentrações salivares baixas de amílase salivar, anidrase carbónica e fosfato (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Malathi et al, 2014; Pink et., 2009).

A nível do diagnóstico sanguíneo de anticorpos, existe no SSJ e noutras doenças reumatóides, autoanticorpos que atuam diretamente contra os antígenos SSA e SSB. O antígeno SSA é constituído por duas proteínas, a Ro52 e Ro60, e o antígeno SSB é constituído por uma única proteína, La. Os autoanticorpos para o SSA e SSB são detetáveis através de dois métodos, o método de ELISA, um teste imunoenzimático que apresenta uma sensibilidade clínica de 70% a 40% respetivamente, e o método de LIPS, “*Luciferase immunoprecipitation systems*”, que apresenta a vantagem de detetar as proteínas individualmente do antígeno SSA. Qualquer alteração nestes anticorpos poderá ser usado como um indicador do SSJ como também poderá fornecer informação acerca do seu progresso permitindo o sua monitorização (Ching et al, 2011; Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Malamud & Rodriguez-Chavez, 2012;).

Uma vez que a saliva apresenta a vantagem de ser um procedimento não invasivo, foram realizados estudos para testar a sua viabilidade como meio de diagnóstico recorrendo à identificação destes auto anticorpos utilizando o método de ELISA. Foi demonstrado que a sua sensibilidade clínica em comparação ao diagnóstico sanguíneo, não correspondia. Desta forma, foi realizado um estudo por Cheng et al. (2011), com o objetivo de avaliar a capacidade do LIPS para o diagnóstico do SSJ baseado em IgG presentes na saliva (Ching et al., 2011).

Neste estudo foram envolvidos 27 doentes saudáveis sem SSJ como grupo de controlo, e 27 doentes com SSJ. Foram analisadas as amostras sanguíneas obtidas na fase inicial e as amostras salivares de ambos os grupos de doentes, dando ênfase aos autoanticorpos salivares de anti-Ro52 e anti-Ro60 pelo método de LIPS. Foi possível demonstrar através do LIPS uma especificidade de quase 100% e uma sensibilidade aproximada de 70% para ambos os auto anticorpos salivares Ro52 e Ro60. Salienta-se ainda que o anti-Ro60 detetado pelo LIPS nos doentes com SSJ foi encontrado em concentrações 400 vezes maior do que no grupo de controlo o que permitiu distinguir os doentes seropositivas do grupo controlo (Ching et al., 2011).

O estudo demonstrou que não houve correlação significativa entre os autoanticorpos obtidas pela saliva e o sangue, como também não houve correlação significativa quanto aos níveis baixos de auto anticorpos observados na saliva em

comparação ao sangue. No entanto, ambas as amostras seropositivas e seronegativas foram detetadas no sangue e saliva. O autor defende que a possível causa para a falta de correlação poderá dever-se ao facto das imunoglobulinas encontradas na saliva serem relativamente distintas em comparação às mesmas encontradas no sangue (Ching et al., 2011).

Uma vez que os marcadores Ro52 e Ro60 não são específicos para a Síndrome de Sjogren, pode tornar-se possível o diagnóstico de Lúpus Eritematoso e outras doenças reumatológicas, no entanto, ainda são necessários mais estudos utilizando o LIPS para validar e estandarizar os biomarcadores salivares como meio de diagnóstico do SSJ. Existe potencial para a sua aplicação em exames orais de rotina como complemento ao diagnóstico (Ching et al., 2011).

Como já referido anteriormente, o diagnóstico da Síndrome de Sjogren continua a ser um desafio uma vez que não existe nenhum marcador salivar ou sanguíneo que possa fornecer um diagnóstico preciso para esta doença autoimune. No entanto, nalguns estudos, o baixo nível de fluxo salivar tem vindo a dar importância para o diagnóstico do SSJ (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010).

Num estudo realizado por Maeshima, Koshiba, Furukawa, Maeshima e Sakamoto (2014), foi avaliada a habilidade da secreção salivar residual como marcador de diagnóstico diferencial em doenças autoimunes.

No caso da esclerose sistémica (ES), uma doença autoimune que tem vindo a demonstrar complicações quando associada a xerostomia devido à possível associação concomitante à Síndrome de Sjogren e fibrose glandular. Foi observado em cerca de 60% de doentes com doenças autoimunes não complicadas por SSJ, uma diminuição no fluxo salivar, sendo que a maioria afetada foi atribuída aos doentes com ES (Maeshima et al., 2014).

Como já foi referido, na SSJ, há destruição estrutural das glândulas salivares o que leva que haja respostas inadequadas pelas glândulas salivares mesmo quando estimuladas. No entanto, se a diminuição do fluxo salivar estiver relacionada a estes danos, implica que a função das glândulas salivares residuais esteja preservada permitindo uma resposta a uma estimulação induzida (Maeshima et al., 2014).

Desta forma, neste estudo, os autores recorreram a um componente com pimenta que estimula a salivação, a capsaicina, de forma a examinar a resposta salivar e a capacidade de secreção salivar residual dos doentes com doenças auto imunes (Maeshima et al., 2014).

Foram avaliados os níveis de fluxo salivar da saliva estimulada e não estimulada dos doentes. Em ambas as amostras obtidas por estes dois métodos foi observado em doentes com SSJ e em doentes com ES, níveis de fluxo salivar significativamente baixos quando comparados com doentes portadores de outras doenças autoimunes. Salienta-se ainda que não houve aumento no fluxo salivar após paragem da estimulação salivar nos doentes com SSJ e ES.

Desta forma, foi possível concluir do estudo que existe a possibilidade da secreção residual salivar servir de marcador para o diagnóstico diferencial de doenças autoimunes (Maeshima et al., 2014).

## **4.2. Esclerose Múltipla**

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune crónica envolvida na destruição ou mau funcionamento das células produtoras de mielina resultando na desmielinização e neuro degeneração. Caracteriza-se como uma doença inflamatória que incide maioritariamente nos adultos jovens entre os 20 e os 40 anos de idade, ocorrendo inicialmente uma atividade mediada por células T. No entanto, a EM ainda não está totalmente compreendida, baseado na evidência científica a doença é entendida como sendo multifatorial, uma vez que associa a componente genética e o componente ambiental, como a deficiência de vitamina D ou a infeção pelo vírus de Epstein-Barr (Fernandez et al., 2014; Malathi et al., 2014).

A nível do diagnóstico salivar, alguns autores tem investigado se há diferenças significativas na saliva dos doentes com EM, mas sem sucesso havendo apenas evidência de baixos níveis na produção de IgA salivar nestes doentes (Malathi et al., 2014).

No entanto, no tratamento da EM é possível identificar biomarcadores para um fármaco. No caso do interferão  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), apesar de possuir um mecanismo complexo que envolve várias células diferentes e com efeitos diferentes, existe a possibilidade de reconhecer ou mesmo prever quais os doentes que responderam ao tratamento se for possível elucidar as diferenças entre os doentes que respondem ao tratamento e aos que não respondem (Fernandez et al., 2014).

Num estudo realizado por Minagar et al. (2007) foi avaliado o antígeno leucocitário humano (HLA) na saliva como potencial marcador na resposta terapêutica do interferão  $\beta$ -1 $\alpha$  (IFN  $\beta$ -1 $\alpha$ ) na EM. O HLA circula no sangue, plasma e outros fluidos corporais com funções imunomodulatórias. Existe o HLA classe I e II, dos quais se encontram em concentrações estáveis em indivíduos sem esta doença. O HLA-I encontra-se em concentrações sanguíneas elevadas quando existe alguma doença inflamatória, havendo também evidência de concentrações elevadas na saliva de doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico, no entanto, a sua concentração quantitativa é baixa na saliva, urina, e fluidos corporais. No caso do HLA-II, não há evidência de concentrações elevadas salivares ou sanguíneas na presença de doenças inflamatórias ou reumatológicas, no entanto, é rotineiramente detetada na saliva, urina e fluidos corporais (Minagar et al., 2007)

Salienta-se que o papel de HLA na patogénese de Esclerose Múltipla ainda não está totalmente compreendido, no entanto, há estudos que observaram correlações de HLA-I e HLA-II no sangue e no líquido céfalo-raquidiano de doentes com EM. O mesmo se aplica num estudo reportado pelo mesmo autor, Minagar et al. (2007) que verificou correlações de HLA-II na saliva e líquido céfalo-raquidiano. Desta forma, neste estudo, o autor pretendeu avaliar os níveis da resposta salivar de HLA-II e HLA-I em doentes com EM recidivante remitente (EMRR) submetidos a terapia com o IFN- $\beta$ -1 $\alpha$ . Os doentes foram submetidos a exames neurológicos e a exames de ressonância magnética para comparar os resultados obtidos.

No estudo não foi possível detetar os níveis salivares de HLA-I, no entanto, foi possível determinar os níveis de HLA-II dos quais se encontrava em concentrações significativamente mais elevadas do que no grupo controlo demonstrando também um aumento sólido antes e depois do tratamento com IFN- $\beta$ -1 $\alpha$ . Verificou-se que este aumento de HLA-II salivar se associava a uma positiva e estável avaliação neurológica com consequente diminuição de lesões cerebrais visualizadas nos exames obtidos pela ressonância magnética (Minagar et al., 2007).

Desta forma, foi possível concluir pelo estudo que de facto o tratamento de doentes com esclerose múltipla com IFN- $\beta$ -1 $\alpha$  pode indicar que este marcador regula a expressão de moléculas HLA-II e que o aumento salivar de HLA-II produz uma resposta terapêutica favorável ao IFN  $\beta$  I- $\alpha$ . No entanto ainda serão necessários mais estudos para aceder ao potencial do HLA-II como marcador da atividade de EM e a sua resposta terapêutica (Minagar et al, 2007).



## **5. Diagnóstico salivar para a detecção e monitorização de drogas e medicamentos.**

O uso da saliva para a monitorização e detecção de drogas ilícitas e medicamentos, tem vindo a crescer e está a tornar-se uma alternativa as amostras tradicionais de urina (Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2009).

Devido a alta vascularidade das glândulas salivares, a passagem de certos medicamentos e drogas do sangue para a saliva é facilitada. As drogas que possuem moléculas de pequena dimensão, com características lipofílicas e não ionizados, efetuam a sua passagem por difusão. Estas moléculas apresentam-se sob duas formas: ligada e não ligada. A fração livre ou não ligada, é usualmente transportada por difusão para a saliva e corresponde ao componente que exhibe os efeitos farmacológicos. Desta forma, a saliva em comparação ao sangue, pode possuir a vantagem de fornecer os componentes farmacologicamente ativos para a monitorização de drogas enquanto que no sangue existem estas moléculas nas duas formas mencionadas. Nalguns casos, as drogas até podem aparecer primeiro na saliva antes de aparecer no sangue e por vezes em concentrações semelhantes ao sangue senão em concentrações mais elevadas devido à sua acidez, como no caso de cocaína, anfetaminas e alguns opióides. Salienta-se ainda que os níveis de algumas drogas ou medicamentos, permanecem na saliva após a ingestão, durante algumas horas ou dias, o que torna a saliva um meio de diagnóstico útil tanto para forças policiais como para médicos, clínicas e fins forenses (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Greabu et al., 2009; Malathi et al., 2014; Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2009).

Atualmente é possível detetar vários níveis de diferentes fármacos na saliva como o lítio, carbamezapina, barbitúricos, benzodiazepinas, fenitoína, teofilina e ciclosporina, antipirina, a cafeína, a cisplatina, o diazepam, digoxina, etossuximida, irinotacan, metadona, metoprolol, oxperanolol, paracetamol, primidona, procainamida, quinina, sulfanilamida e tolbutamida (tabela 3). É também útil para a detecção de um amplo variedade de drogas de abuso tais como anfetaminas, benzodiazepinas, cocaína, uma variedade de inalantes, etanol, marijuana, nicotina, opióides e fenciclidina (Chiappin et al., 2007; Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Greabu et al., 2009; Malathi et al., 2014).

No caso do **etanol**, a sua detecção geralmente é realizado por análises toxicológicas, no entanto, a as análises à saliva apresenta percentagens por volta dos 9% maior de etanol em comparação com o plasma (Martí-Álamo et al., 2012).

Os níveis salivares de **nicotina** também são usados para monitorizar os níveis de exposição ao tabaco. Apresenta-se como um alcalóide principalmente encontrado em produtos tabágicos. Devido à sua ação direta na cavidade oral, ele é metabolizado pelo organismo em duas substância, cotinina e 3-hidroxicotinina. Estes dois metabolitos são monitorizados para determinar a intensidade de fumadores passivos, sendo no caso da detecção de cotinina é indicativo tanto de fumadores passivos como ativos. No caso de mulheres grávidas, este é um dos métodos utilizados para monitorizar níveis de tabaco tanto em fumadoras ativas como passivas. O mesmo se aplica no caso da detecção de Cannabis ou Marijuana, estes geralmente encontram-se no organismo quando é fumado o que explica o aumento de níveis salivares sem a ativação do fluxo salivar. Estudos recentes demonstram que é possível detetar marijuana através da saliva 30 minutos após a sua inalação passiva, no entanto, houve estudos que derrubaram esta teoria com métodos mais precisos (Malathi et al., 2014; Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2007).

A **cocaína**, uma droga ilícita, é um anestésico vasoconstritor também detetável pela saliva independentemente da forma de administração, no entanto, a sua detecção é mais facilmente obtida quando a cocaína é inalado por via intranasal ou fumado. Esta droga apresenta-se na saliva após a sua administração, durante uma hora aproximadamente, no entanto, os seus níveis decrescem significativamente pouco tempo depois, resultando em concentrações muito semelhantes às encontradas no sangue (Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2007).

A **heroína**, uma droga também ilícita é um derivado de acetilado da morfina. A sua administração geralmente é por via intravenosa, permitindo uma distribuição rápida no sistema nervoso central devido à sua elevada liposolubilidade resultando em efeitos de euforia. Após dois minutos, o seu nível salivar é máximo e comparável às concentrações sanguíneas. A sua concentração salivar aumenta no caso se for administrado fumado, revelando um decréscimo na sua concentração após 30 a 60 minutos atingindo os valores sanguíneos (Martí-Álamo et al, 2012; Pink et al, 2007).

No caso da **morfina**, é um fármaco pertencente à família dos opióides com efeitos analgésicos que provoca mudança de humor e dependência a longo prazo. Após administração parental, é possível detetar a presença de morfina livre na saliva devido à

rápida metabolização por conjugação. Salienta-se ainda que é possível detetar vestígios de morfina com ingestão de sementes de papoila ou fumando heroína (Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2007).

A **codeína** é também detetável na saliva com concentrações 3 a 4 vezes maior que no sangue. A codeína é um fármaco que suprime a dor e a tosse. Após uma hora de ingestão oral de 60 a 120mg, é detetável no fluido oral apresentando uma concentração máxima depois de 1.6 a 1.7 horas (Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2007).

No caso de **anfetamina**, é uma amina simpáticomimética com funções estimulantes a nível do sistema nervoso central. Os seus metabolitos são excretados pela urina, sendo que a sua concentração é dependente do pH presente. No caso de um pH ácido, 60% é excretado, enquanto que na presença de um pH alcalino a sua excreção é de 1 a 5%. É de salientar que a anfetamina é também produzida pelo corpo como um produto através da metabolização de metanfetamina que aparece no fluido oral após a obtenção de uma dada concentração no plasma. Quando a metanfetamina é administrada, após dez minutos, é detetável a sua presença na saliva com uma prevalência de 72 horas enquanto que após a inalação ou ingestão de metanfetamina, é possível detetar a sua presença após 500 minutos (Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2007).

Ao nível da monitorização dos **barbitúricos**, existem poucos estudos a nível da análise salivar deste fármaco devido ao facto de possuir uma natureza viciante. Os barbitúricos possuem efeitos sedativos e hipnóticos que são administrados geralmente por via oral para o tratamento de estados convulsivos. Estes fármacos podem ser de curta ou longa duração. No caso dos fármacos de curta duração foi demonstrado que após uma hora da sua administração, foi encontrado em elevadas concentrações na saliva, mantendo-se estável durante 50 horas (Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2007).

No caso das **Benzodiazepinas**, são fármacos com efeitos hipnóticos, sedativo, antipsicóticos e anti-epilético. Atualmente, como no caso dos barbitúricos, existem poucos estudos a nível do diagnóstico salivar deste grupo farmacológico. No entanto, apesar de estudos limitativos, devido ao uso frequente de diazepam por parte dos doentes, este fármaco foi estudado. Foi demonstrando que a presença do seu metabolito, nordiazepam, revelou uma persistência na saliva de 45 minutos após a sua administração (Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2007).

**Tabela 3** -Deteção salivar de drogas e outros medicamentos

<b>Substâncias</b>	<b>Características da deteção salivar</b>
<b>Drogas</b>	
<b>Álcool</b>	A concentração salivar do etanol é 9% maior do que no plasma
<b>Nicotina</b>	Verificação de metabolitos: cotinina e 3-hidroxicotinina
<b>Cannabis</b>	Tetrahydrocannabiol salivar é detetável muito cedo e permanece até 14horas.
<b>Cocaína</b>	Os níveis salivares mantêm se altas até 1 hora após administração. Semelhante aos níveis sanguíneas.
<b>Anfetamina</b>	Detetáveis 10 minutos após administração e até 72 horas depois
<b>Metanfetamina</b>	Detetável na saliva até 510 minutos apos de inalada, fumada e ingerida.
<b>Heroína</b>	Os níveis salivares são semelhantes aos níveis sanguíneos e alcança a sua concentração máxima após 2 minutos.
<b>Medicação</b>	
<b>Barbitúricos</b>	Maior concentração salivar 1 hora após a administração mantendo-se estável durante 50 horas.
<b>Benzodiazepinas</b>	O noradiazepam aparece na saliva 45 minutos após a administração.
<b>Codeína</b>	Detetável na saliva 1 hora depois de tomada; Concentração salivar 3-4 vezes maior do que no plasma.
<b>Morfina</b>	Detetável na saliva logo após a administração parentérica.

Adaptado de Saliva as a diagnostic fluid . Literature review, 2012

## **6. Doenças infecciosas**

Devido ao desenvolvimento de novas vacinas, medicamentos e antibióticos, permitiu que a incidência em torno destas doenças se mantivesse baixo, à exceção da SIDA. No entanto, apesar dos avanços na medicina, a distinção de uma infecção bacteriana de uma infecção viral continua um grande problema clínico. Desta forma, o uso de antibióticos que constitui um tratamento eficaz no caso de uma infecção bacteriana, muitas vezes é administrado incorretamente devido a dificuldade de distinção destas doenças virais, o que muitas vezes leva, para além de um tratamento ineficaz, ao uso inadequado de antibióticos o que resulta em reações alérgicas, resistência bacteriana. No entanto, apesar da devoção por parte dos investigadores para esclarecer este problema clínico, atualmente ainda não existe nenhum teste de diagnóstico para diferenciar estas patologias infecciosas (Corstjens, Abrams, & Malamud, 2012; Malathi et al., 2014; Pink et al., 2009).

Independentemente da falta de dados para diferenciar as infeções bacterianas das virais, uma das grandes vantagens para o desenvolvimento de testes de diagnóstico é facto de um único biomarcador ser suficiente para identificar o agente patogénico. Em contraste, no que respeita às doenças sistémicas como a diabetes, doença cardiovascular, doença de Alzheimer, são necessários múltiplos biomarcadores ou um perfil muito particular, que pode fornecer uma pista mas raramente um diagnóstico definitivo (Corstjens et al., 2012; Malathi et al., 2014;).

O diagnóstico dos agentes patogénicos bacterianos e virais na saliva é realizado através da medição de duas formas de combinação: anticorpo e antígeno ou anticorpo e ácido nucleico. Uma fonte rica em anticorpos e uma variedade de IgA, IgG e IgG é obtida da cavidade oral em particular do transudato da mucosa oral e da língua através da passagem com uma compressa ou cotonete. Foi através da descoberta dos anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que se conseguiu a primeira prova definitiva, o que demonstrou o potencial do fluido oral na monitorização e diagnóstico. Com a presença de anticorpos na saliva é possível identificar os patogéneos conhecidos, no entanto é necessário considerar as políticas de vacinação utilizadas por diversos países pois pode haver uma reatividade positiva nos testes de anticorpos administrados anteriormente, como no caso do HIV. Em contraste, se o objetivo do diagnóstico é a

identificação do antígeno ou ácido nucleico associado a um agente patogénico, nem sempre é detetável na saliva. (Corstjens et al., 2012; Malathi et al., 2014)

### **6.1. Infecções virais**

As infeções virais como o HIV, vírus da hepatite C (HCV) e o vírus do papiloma humano (HPV) tem um enorme impacto sobre as taxas de mortalidade e morbilidade, sendo responsáveis por uma série de epidemias globalmente. O risco de sequelas de infeções por HPV e HCV não são muito reconhecidos pelas populações como o risco de infeção por HIV, mas demonstram elevadas taxas de morte, revelando nalgumas cidades como no caso de Atlanta nos EUA, um maior numero de mortes por HCV do que por HIV. Salienta-se ainda que o HPV atualmente, está associado a cancro oral, quando antigamente era originalmente associado ao cancro cervical (Corstjens et al., 2012).

Atualmente o diagnóstico de HIV por via oral, é facilmente detetado após um teste de rastreio de anticorpos após a seroconversão do doente. No entanto, o seu diagnóstico precoce é complicado uma vez que, os sintomas que surgem inicialmente são semelhantes a uma gripe leve e também devido ao facto de necessitar com semanas de antecedência, antes da seroconversão do doente, da realização de um teste para a identificação de ácido nucleico ou de um antígeno (Corstjens et al., 2012).

O diagnóstico do HIV por via oral é baseado nos testes de rastreio que detetam os anticorpos HIV-1 ou a combinação de HIV-1 e HIV-2 através do método da ELISA (“*Enzyme-linked immunosorbent assay*”). Os testes para a deteção destes anticorpos geralmente envolvem o uso de tiras constituídas por nitrocelulose que possuem duas faixas de captação: uma faixa correspondente a linha de teste que faz a deteção específica do HIV-1 ou da combinação de ambos os anticorpos HIV-1 e HIV-2, e a segunda faixa correspondente a linha de controlo, capta todos os anticorpos presentes na amostra. É de salientar que após a obtenção de resultados positivos com o teste de ELISA, é necessário realizar dois testes para a confirmação dos resultados. Este teste pode ser através do “*Western Blot*” que envolve o uso de saliva ou de sangue que também deteta vários antígenos para o HIV como o p24, ou então pode-se optar por um teste sanguíneo através do CPR (cadeia polimerase de reação) que deteta o RNA do HIV. Através da combinação do teste Western Blot com o método de ELISA, a deteção

do HIV, em comparação com o sangue e a urina, apresenta uma grande vantagem uma vez que se consegue obter uma elevada especificidade por volta dos 99,8% e uma sensibilidade de 99,3% (Corstjens et al., 2012; Pink et al., 2009; Yoshizawa et al., 2013).

Desta forma, existem atualmente no mercado vários aparelhos para o teste de HIV, entre eles, o “*OraQuick ADVANCE Rapid HIV-1/2*”, o único aparelho aprovado pelo FDA (“*Food and Drug Administration*”) no ano 2004. Através deste teste é possível obter resultados num espaço de 20 minutos (Corstjens et al., 2012).

No caso do diagnóstico do vírus da hepatite, é necessário primeiramente a deteção dos anticorpos, no caso de um resultado positivo, seguidamente é realizado um teste de confirmação através do *Western Blot* e um ensaio baseado em ácidos nucleicos virais. Estudos recentes demonstram a presença de anticorpos na saliva para a hepatite A, B e C. Estudos tem vindo a demonstrar uma correlação entre os níveis salivares e sanguíneos de IgG com os anticorpos do HCV e HAV. Salienta-se ainda, que após a imunização do HAV tem vindo a ser demonstrada a existência de anticorpos correspondentes na saliva. Acrescenta-se ainda que no caso HBV e HCV estudos revelam a presença dos seus DNA's, anticorpos e antigénios virais, dos quais se correlacionem com níveis sanguíneos destes (Chiappin et al., 2007; Corstjens et al., 2012; Malathi et al., 2014).

Existem testes disponíveis no mercado europeu, que detetam com rapidez através da saliva, a presença de anticorpos para o vírus da hepatite. Embora nenhum deles foi provado ser eficaz através de uma amostra salivar. No entanto existe um teste, “*Oraquick HCV Rapid Antibody Test*” para a hepatite C, que apesar de não se encontrar aprovado pelo FDA, apresenta resultados semelhantes aos obtidos através da análise sanguínea de anticorpos com uma percentagem de 97.5%. (Corstjens et al., 2012; Malathi et al., 2014; Yoshizawa et al., 2013).

No caso do HPV, existe uma variedade de diferentes tipos dos quais 20% se tornam malignos. O HPV tipo 16 e 18 associam-se a 70% dos cancros a nível cervical, havendo também uma associação com o cancro do carcinoma de células escamosas que correspondendo a 60% dos tumores. Existem testes salivares disponíveis para a deteção de HPV que envolve o uso do CPR no entanto ainda são necessários mais estudos para comprovar a sua eficácia (Corstjens et al., 2012).

## 6.2. Infecções bacterianas

Na cavidade oral existem centenas de bactérias, dos quais a maioria não são patogênicas e em simbiose com outras bactérias. No caso da bactéria *Helicobacter pylori*, desempenha um papel importante na ecologia do estômago, sendo considerada a causa mais comum para o desenvolvimento de úlceras pépticas, gástricas e duodenais e atualmente também é um fator de risco para o desenvolvimento de linfoma do tecido linfoide associada a mucosa (LTAM). Atualmente, o cultivo desta bactéria passa por uma biópsia à mucosa estomacal, um método tradicional invasivo, no entanto tem vindo haver estudos que através de amostras salivares que detetam o DNA específico de *H.pylori* com a ajuda do PCR permitindo a identificação desta infecção na sua fase activa. (Malathi et al., 2014; Martí-Álamo et al., 2012; Pink et al., 2009).

Uma vez que a cavidade oral poderá atuar como um local propicio para este tipo de bactéria torna possível que haja reinfeção gástrica. Estudos têm vindo a demonstrar que esta bactéria se encontra presente na saliva de doentes com patologias gástricas após a confirmação de uma biópsia gástrica. Revelou-se que *H.pylori* se encontrava na maioria dos casos em doentes com gengivites e periodontite, o que poderá justificar o facto de haver resistência ao tratamento antibiótica (Martí-Álamo et al., 2012).

Também tem havido estudos que demonstram a presença de níveis elevados de mucinas salivares MUC-5B e MUC7 que poderá servir de indicadores de infecção por *H.pylori* uma vez que esta bactéria liga a estas mucinas (Malathi et al., 2014).

No caso da deteção da *Mycobacterium tuberculosis* foi encontrado na saliva através do método de PCR com uma percentagem de 98%. Esta bactéria apenas surge na saliva quando a infecção se encontra numa fase aguda e os níveis desta bactéria se encontram elevados (Pink et al., 2009).

As bactérias saudáveis não são diretamente detetáveis no fluido oral, no entanto estas duas bactérias, *Mycobacterium tuberculosis* e *Helicobacter pylori* demonstram que a saliva contém marcadores para estes patogenos (Pink et al., 2009).



## **Doenças Orais**

### **1. Cancro Oral**

O cancro oral atualmente continua com um prognóstico muito reservado. Para cinco anos de sobrevivência, a taxa de mortalidade ronda os 40%-62%, valores que durante estes últimos 50 anos permanecem iguais. O cancro oral possui a capacidade de alastrar para os diferentes partes do corpo como o pescoço e pulmões, através das células que atravessam o sistema linfático (Cheng, Rees, & Wright, 2014; Ptaffe et al., 2011; Ravindran & Deepa, 2012).

O diagnóstico do cancro oral é realizado geralmente por dentistas ou profissionais de saúde, que realizam exames meticolosos à cavidade oral, no entanto, apesar de uma visualização direta da cavidade oral muitos cancros como o cancro de células escamosas apenas são observados quando atinge estádios mais avançados, razão pela qual autores defendem ser a causa principal da sua elevada taxa de mortalidade. O carcinoma oral de células escamosas (COCE) é o cancro mais prevalente dos cancros orais. Representa 90% dos cancros orais (Brinkmann et al., 2011; Cheng et al., 2014; Hu et al., 2010).

A análise salivar poderá auxiliar no diagnóstico precoce de certos tumores malignos. Meios de diagnóstico para a deteção precoce do cancro de células escamosas estão em desenvolvimento incluindo estudos de biomarcadores salivares. No caso de marcadores específicos de DNA e RNA de cada tumor e células resultantes de lesões e de inflamação poderão ser úteis como marcadores para o COCE.

A proteína P53, é uma proteína supressora de tumor sintetizada dentro das próprias células como resultado da exposição a vários tipos de DNA danificados dentro da célula. Uma das causas principais e mais frequentes no desenvolvimento do cancro humano é quando ocorre a inativação da proteína supressora P53 devido a mutações e deleções de genes. Desta forma, com a acumulação da proteína P53 inativada leva a produção de anticorpos contra o gene P53. Estes anticorpos são detetáveis no soro e segundo muitos autores, também na saliva de doentes com cancro de carcinoma de células escamosas o que pode auxiliar no diagnóstico precoce desta patologia. (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Malathi et al., 2014; Ravindran & Deepa, 2012).

Num estudo realizado por Hu et al. (2010) entre doentes com COCE e doentes saudáveis foi possível identificar na saliva dos doentes afetados anticorpos para P53, apresentando uma correlação positiva entre estes anticorpos no soro e na saliva. No entanto o autor defende que o poder de prever a deteção de COCE ainda é limitado.

Defensina salivar I também se encontra presente na saliva de doentes com OSCC. Esta proteína salivar é constituída por péptidos que possuem propriedades antimicrobiais e citotóxicas, localizando-se nos grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares. Este biomarcador também foi encontrado com níveis elevados em doentes com OSCC relevando uma correlação positiva no soro e a na saliva (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Ravindran & Deepa, 2012).

Segundo Spielmann & Wong (2012), num estudo realizado com doentes saudáveis e doentes afetados com OSCC numa fase inicial, foram detetados sete biomarcadores com elevadas concentrações na saliva. Estes biomarcadores foram os seguintes: DUPSI (*Dual specificity phosphate1*) é um mediador responsável pela sinalização da passagem do tumor supressor PTEN, H3F3A (histona h3 da família 3A), IL1B (interleucina 1 B) e IL8 (interleucina 8) que tem fortes associações a diferentes cancros, no caso de IL8, que possui correlação também com o cancro da cabeça e do pescoço, OAZ1 (*Ornithine descarboxylase antizyme 1*) tumor supressor com funções inibitórias do *Ornithine descarboxylase*, SAT (*spermidine/ spermine N1-acetyltransferase*) e S100P (*S 100 calcium binding protein P*). Verificou-se que houve grande especificidade (91%) entre os doentes afetados e os de controlo através da associação destes biomarcadores. No entanto são necessários mais estudos uma vez que há controvérsia nos resultados com outros estudos (Ravindran & Deepa, 2012; Spielmann & Wong, 2012).

Acrescenta-se ainda através de vários estudos, a existência na saliva de doentes com cancro de carcinoma de células escamosas os seguintes marcadores: Fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), TNF- $\alpha$ , IL1- $\alpha$ , IL6, IL8, TNF-recetor I, proteína C reativa (PCR). À exceção do IL8 e o fator de crescimento endotelial vascular, as concentrações dos biomarcadores no soro poderiam corresponder aos estádios clínicos da doença. No entanto, as concentrações destes biomarcadores também apresentam resultados controvérsias entre autores, havendo uma necessidade de validar a especificidade destes biomarcadores recorrendo a amostras mais significativas (Monteiro et al., 2014; Ravindran & Deepa, 2012).

A hormona cortisona também foi encontrada em doentes com COCE com níveis elevados tanto na saliva como no soro, podendo ser um biomarcador útil para o diagnóstico desta doença (Monteiro et al., 2014).

Foram realizados estudos para o diagnóstico de COCE através da avaliação bioquímica e imunológico dos parâmetros salivares. Verificou-se níveis elevados de sódio, cálcio, fosfato inorgânico, magnésio, albumina, lactato desidrogenase, IgG, fator de crescimento insulina (IGF) e metaloproteínas. O ácido siálico é outro constituinte de várias glicoproteínas salivares que também se encontra com níveis elevadas na saliva (Ravindran & Deepa, 2012).

Desde o ano 1990, foram descobertas mais de 100 potenciais biomarcadores para o carcinoma de células escamosas. Apresenta-se uma tabela com os biomarcadores reportadas desde 2013 pelos autores Cheng et al (2014). Salienta-se que os estudos realizados para a descoberta de biomarcadores salivares no cancro oral, a maioria foram baseados em estudos de comparação de concentrações e níveis destes biomarcadores em doentes saudáveis e com cancro, como já foi evidenciado nalguns estudos acima mencionados. No entanto em relação aos níveis de IL-6, IL-8 e endotélio-1 referenciados anteriormente, o autor Cheng et al. (2014) reporta que houve estudos que não encontraram grandes alterações entre os doentes afetados e os seus grupos de controlo.

**Tabela 4-** Biomarcadores salivares para a deteção de cancro oral reportadas desde 2013

<b>Categoria</b>	<b>Potencial Biomarcador salivar para OSCC</b>
<b>Componente não orgânico</b>	Na, Ca, F e Mg
<b>Peptido</b>	Defensina 1
<b>Proteínas</b>	P53 autoantibody
	$\alpha$ -amilase
	IL-8
	TNF- $\alpha$
	IL-1
	IL-6
	Statherin

Adaptado de A review of research on salivary biomarkers for cancer detection,2014.

**Tabela 4-** Biomarcadores salivares para a detecção de cancro oral, reportadas desde 2013 (continuação)

<b>Categoria</b>	<b>Potencial Biomarcador salivar para OSCC</b>
<b>Proteínas</b>	Fator de crescimento de fibroblastos básico
	Cyfra 21.1
	Antigénio polipéptido do tecido (TPA)
	Cancro Antigénio 125 (CA125)
	Endotelina-1
	IL-1 $\beta$
	CD44
	Proteína salivar total
	Factor de crescimento insulina 1 (IGF-1)
	MMP-2
	MMP-9
	Catalase
	Profilin
	S100A9/MRP14
	M2BP
	Antigenio carcinoembrionário (CEA)
	Carcinoma antigénio associado
	CA-50
	Carbonyls salivares
	Ciclina D1
	Maspin
	8-oxoguanina ADN-glicosilase (OGG1)
Fosforilado- Src	

Adaptado de A review of research on salivary biomarkers for cancer detection, 2014

**Tabela 4-** Biomarcadores salivares para a detecção de cancro oral, reportadas desde 2013  
(continuação)

<b>Categoria</b>	<b>Potencial Biomarcador salivar para OSCC</b>
<b>Proteína</b>	Ki-67
	Lactato Desidrogenase
	Transferrina
	Proteína de dedo de zinco 501 Péptido
	Hemopexina
	Haptoglobina complemento C3
	Transthyretin
	$\alpha$ 1 –antitripsina
<b>DNAs</b>	Gene P53 códon 63
	A perda de heterozigosidade na combinação dos marcadores D3S1234 , D9S156 , e D17S799
	ADN mitocondrial ( citocromo c oxidase I e citocromo c oxidase II )
	Hipermetilação dos promotores nos genes supressores de tumores: DAPK , DCC , hortelã - 31, TIMP -31, TIMP-3 , p16 , MGMT , CCNA1
<b>mRNAs</b>	IL-8
	IL-1 $\beta$
	DUSP1 (dual especificidade fosfatase 1)
	H3F3A (H3 3A família histona )
	OAZ1 (ornithin antizyme descarboxilase 1)

Adaptado de A review of research on salivary biomarkers for cancer detection,2014

**Tabela 4-** Biomarcadores salivares para a detecção de cancro oral, reportadas desde 2013  
(continuação)

<b>Categoria</b>	<b>Potencial Biomarcador salivar para OSCC</b>
<b>mRNAs</b>	S100P ( S100 proteína de ligação de cálcio P)
	SAT ( espermidina / espermina N1- acetiltransferase EST )
<b>Micro RNAs</b>	miR-125 <sup>a</sup>
	miR-200 <sup>a</sup>
	miR-31
<b>Long non-coding RNAs</b>	HOTAIR
<b>Moléculas relacionadas ao stress oxidativo</b>	Espécies reativas de nitrogênio ( RNS) , como o óxido nítrico ( NO) , nitritos (NO2) e nitratos (NO3)
	Peroxidase
	A glutathione -S-transferase ( GST )
	Superóxido dismutase ( SOD )
	8 - hidróxi - 2 - desoxiguanosina ( 8 - OHdG )
	Glutathione
	Malondialdeído (MDA)
<b>Glucocorticoide</b>	Cortisol

Adaptado de A review on research on salivary biomarkers for oral cancer,2014

**Tabela 4-** Biomarcadores salivares para a detecção de cancro oral, reportadas desde 2013 (continuação)

<b>Categoria</b>	<b>Potencial Biomarcador salivar para OSCC</b>	
<b>Metabolomics</b>	Cadaverina	Alanina
	Fenilalanina	C5H14N5
	Valina	Piperidina
	Ácido láctico	Taurina piperideine
	Ácido pipercolic	C4H9N
	Alfa – aminobutirico	C8H9N
	Pirrolina	Betaína
	Tirosina	C6H6N2O2
	Histidina	Leucina + isoleucina
	Triptofano	Beta – alanina
	Ácido glutâmico	Treonina
	Serina	Glutamina
	Colina	Carnitina
	C4H5N2O11P	Ácido hidroxicarboxílico
<b>Moléculas relacionadas-glicosilação</b>	Ácido siálico	
	$\alpha$ –L- fucosidase	
<b>Outro</b>	Atividade da telomerase	

Adaptado de A review on research on salivary biomarkers for oral cancer,2014

Apesar dos biomarcadores apresentarem a vantagem de ser um método não invasivo para o diagnóstico do cancro é preciso resolver algumas questões: em primeiro lugar, é necessário a standardização da colheita salivar a forma como é processada e armazenada pois pode influenciar os resultados. Existem grandes variações nos níveis observados dos biomarcadores salivares em doentes com cancro e os doentes sem cancro o que dificulta a determinação de um nível de referência para os potenciais biomarcadores para o cancro oral. É necessário mais validação dos biomarcadores para o cancro oral na presença de condições inflamatórias comuns, pois é desconhecido se as inflamações influenciam os níveis dos biomarcadores na cavidade oral. É necessário validar os biomarcadores na presença de outros tipos de cancro uma vez que há

biomarcadores iguais tanto para o cancro oral como para outros cancros como por exemplo a proteína de ligação ao cálcio, S100, encontra também em níveis elevados no cancro do pulmão (Cheng et al., 2014).



## 2. Doença periodontal

A doença periodontal, é uma doença da cavidade oral infecciosa sendo uma das causas mais comuns para a perda de dentes nos adultos. A doença periodontal é derivada de um processo inflamatório crônico irreversível do ligamento periodontal em resposta à placa bacteriana que é depositada a nível da margem gengival e na interface localizada entre o tecido gengival e os dentes (Giannobile, McDevitt, Niedbala, & Malamud, 2011; Kim, Kim, & Camargo, 2013; Malamud & Rodriguez-Chavez, 2012). A doença periodontal tem demonstrado associação com uma variedade de doenças como a doença cardiovascular, acidente vascular cerebral, osteoporose, entre outros.

A doença periodontal é iniciada através da interação complexa entre os periopatogénios e o sistema imunitário do hospedeiro. Com o início da infeção bacteriana segue a destruição de tecidos periodontais que é causada pela atividade dos leucócitos, citocinas, metaloproteinases e entre outros (AlMoharib et al., 2014). Desta forma, o processo desta patologia avança nos doentes que possuem uma pobre higiene oral que leva à recorrente deposição de placa bacteriana com conseqüente proliferação e crescimento bacteriano, levando à formação de uma estrutura complexa, o biofilme bacteriano. Com a formação do biofilme bacteriano ocorre a destruição do ligamento periodontal, formação de bolsas periodontais, leva a reabsorção óssea do osso alveolar com conseqüente migração apical do epitélio juncional. Desta forma, os dentes ganham mobilidade devido à profundidade das bolsas e falta de osso alveolar levando em casos mais severos a perda dos dentes (Giannobile et al, 2011; Greabu & Calenic, 2014; Kim et al, 2013).

Os tecidos gengivais respondem à acumulação de bactérias com inflamação. No caso da gengivite devido a constante acumulação bacteriana, ocorre inflamação levando inicialmente a alterações no tecido gengival o nível do seu volume, forma, cor, textura, que geralmente é acompanhada por sangramento quando é realizada a sondagem (figura 6).

A gengivite apesar de partilhar os mesmos sintomas e sinais da periodontite, diferencia-se por não ocorrer a migração apical do epitélio juncional e destruição do osso alveolar apresentando-se com uma condição reversível quando o biofilme bacteriano é removido profissionalmente (figura 6) (Kim et al., 2013).

**Figura 6-** Sondagem periodontal



Adaptado de Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal disease, 2013

Imagem à esquerda- Ausência de hemorragia após sondagem é um excelente preditor negativo da atividade da doença; Imagem à direita- Presença de hemorragia à sondagem estima o risco para posterior rutura do tecido.

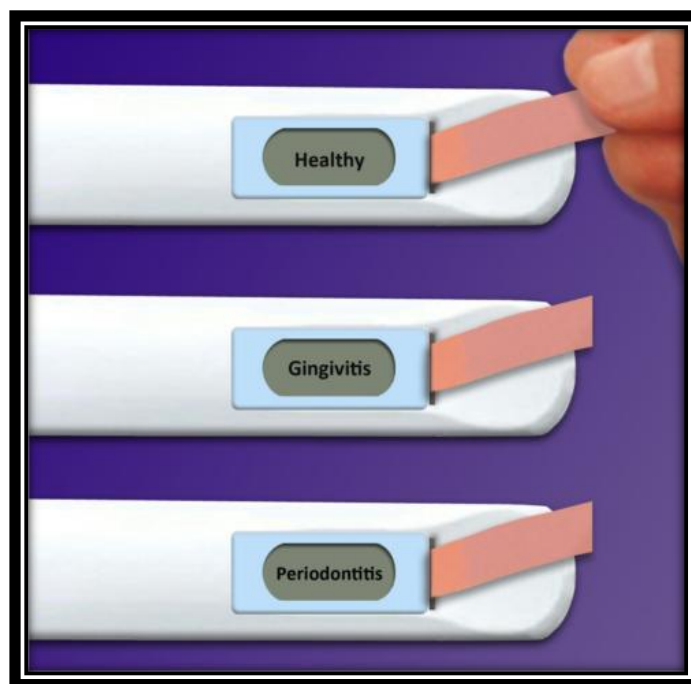
Em muitos casos, o progresso da gengivite leva ao desenvolvimento da periodontite devido à constante inflamação levando a migração dos componentes inflamatórios pelo tecido gengival em direção apical entrando na corrente sanguínea. Este processo inflamatório leva ao aumento da profundidade das bolsas periodontais tornando a remoção do biofilme bacteriano mais difícil desenvolvendo ainda mais a inflamação e destruição tanto do ligamento periodontal como do osso alveolar, contribuindo para a perpetuação da doença periodontal. No entanto a conversão da gengivite em periodontite é um fenómeno que ainda não é totalmente compreendido. O biofilme bacteriana é um fator necessário para a conversão da gengivite para a periodontite, porém o sistema imunitário é também um fator determinante nesta conversão (Kim et al., 2013).

Pelo facto de ser uma doença não dolorosa, os doentes não estão cientes que tem a doença ou optam por ignorar os sintomas e sinais de inflamação gengival e periodontal, permitindo que a doença progrida de tal forma que mesmo com um tratamento periodontal extenso a prevenção da perda dentária já não é possível (Kim et al., 2013).

Em medicina dentária, os parâmetros tradicionais para o diagnóstico periodontal como a sondagem periodontal, hemorragia à sondagem, perda de inserção clínica,

radiografias, é um diagnóstico por vezes limitado uma vez que estes indicadores de doença periodontal precisam de estar presentes para o seu diagnóstico, ou seja, é necessário uma quantidade significativa de lesão para efetuar o diagnóstico tradicional desta doença. Desta forma, investigadores têm vindo a estudar a saliva e os seus marcadores bioquímicos que tem vindo a demonstrar um futuro promissor para o diagnóstico periodontal. Conhecendo o desenvolvimento desta doença, os biomarcadores salivares poderão ajudar no seu diagnóstico precoce. A figura 7 exemplifica um dispositivo que poderá ser utilizado pelos doentes para o seu próprio diagnóstico e monitorização como para os dentistas. O teste é baseado nos biomarcadores existentes na saliva que correlacionam com a periodontite (Kim et al., 2013; AlMoharib et al., 2014).

**Figura 7-** Teste salivar para o diagnóstico periodontal



Adaptados de biomarkers in the diagnosis of periodontal disease, 2013

Dispositivo electroquímico que pode processar os biomarcadores da periodontite. Coloca-se uma tira com saliva no dispositivo, e o resultado da saúde periodontal do paciente é apresentada no ecrã. O dispositivo viria com instruções de follow-up para consultar com um dentista

Durante as últimas duas décadas, investigadores deram ênfase aos fluidos orais provenientes de cada dente individualmente. Este fluido conhecido como fluido crevicular gengival (FCG) é um fluido complexo com origem a partir dos vasos do plexo gengival que contém uma mistura de substâncias derivadas do sangue, células

inflamatórias do hospedeiro, células estruturais do periodonto e bactérias orais. O fluido crevicular gengival chega ao sulco gengival através da passagem pela membrana basal externa e do epitélio juncional. Este fluido pode ser isolado a partir do sulco saudável embora em pequenas quantidades, ele representa no caso de um periodonto saudável, o transudado do fluido intersticial do tecido gengival produzido pelo gradiente osmótico. Em condições de saúde a sua concentração é baixa e pouco abundante enquanto que nos locais de doença a sua abundância aumenta tanto em quantidade como em complexidade de moléculas inflamatórias. Desta forma, quando ocorre o processo da periodontite, os produtos da resposta inflamatória e as moléculas dos tecidos destruídos podem ser encontrados no FCG, contribuindo como mediadores para o possível diagnóstico da doença periodontal (AlRowis et al., 2014; Miller et al., 2010).

O autor AlRowis et al. (2014) fez uma compilação de toda a informação obtida nos relatórios publicados entre o ano 1999 e 2014. Nas tabelas seguintes demonstram os biomarcadores encontrados no FCG e na saliva de doentes com doença periodontal.

**Tabela 5-** Biomarcadores salivares na doença periodontal

<b>Categoria</b>	<b>Bomarcadores</b>	
<b>Enzimas</b>	Lactato desidrogenase	Dipeptidil-peptidase
	Fosfatase alcalina	Alanina aminopeptidase
	MMP-8	$\beta$ – glucuronidase
	Elastase	Mieloperoxidase
	MMP-1	Meschiari
	Aminotransferase	Lisozima
	Amilase	Chitinase
	Arginase	Lactoferrina
	<b>Protéinas</b>	Fibronectina
Fator de crescimento de hepatócitos		Neopterin
IL-6		$\alpha$ -2- macroglobulina
Proteina reativa C		Complemento C3
Inibidor de tecido de metaloproteinase		Queratina,

Adaptado de Oral Fluid Based Biomarkers in Periodontal Disease: Part 1.Saliva,2014

**Tabela 6 -** Biomarcadores salivares na doença periodontal (continuação)

<b>Categoria</b>	<b>Biomarcadores</b>	
<b>Proteínas</b>	Factor de crescimento $\alpha - 1$ - antitripsina, endotelial vascular	
	Albumina	Factor de crescimento epidérmico
<b>Outros</b>	8-OHdG	Cortisol
	Osteoprotegerina	IgG, IgA, IgM S IgA
	Urato	Calcio
	Ascorbato	Melatonina
	Fator ativador de plaquetas	Oxido Nitroso

Adaptado de Oral Fluid Based Biomarkers in Periodontal Disease: Part 1.Saliva,2014

**Tabela 7- Enzimas derivadas do hospedeiro no FCG**

<b>Enzimas derivados do hospedeiro</b>	
MMP-1	Inibidor de $\alpha 1$ - proteinase
MMP-2	$\alpha 2$ -macroglobulina
MMP-3	Aspartato aminotransferase
MMP-8	Glicosidases
MMP-9	Mieloperoxidase
MMP-13	Creatinina quinase
Inibidor de tecido de metaloproteinase 1	Protease neutral
Elastase	Gingipain
Catepsina G,F,B	Beta-N-acetil-hexosaminidase
Plasminogénio	Creatina quinase
Peptidases Dipeptidil	Enzimas de degradação de imunoglobulina Beta-glucuronidase
Fosfatase alcalina	Enzimas semelhantes a tripsina
Beta-glucuronidase	Monocito quimioatrativo proteína( MCP-1)
Stromelysins	Anticorpos antibacterianos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA

Adaptado de Oral Fluid- Based Biomarkers in Periodontal Disease- Part 2. Gingival Crevicular Fluid, 2014

**Tabela 7-** Enzimas derivadas do hospedeiro no FCG (continuação)

Enzimas derivadas do hospedeiro no FCG	
Lactato desidrogenase	RANTES (quimioattractor e ativador de macrófagos e linfócitos)
Lisozima	Dipeptidilpeptidase
Arilsulfatase	Proteínas da fase aguda; lactoferrina, transferrina, $\alpha$ 2-macroglobulina, $\alpha$ 1-proteinase

Adaptado de Oral Fluid- Based Biomarkers in Periodontal Disease- Part 2. Gingival Crevicular Fluid, 2014

**Tabela 8-** Mediadores inflamatórios e resposta modificadora do hospedeiro no FCG

Mediadores inflamatórios e resposta modificadora do hospedeiro	
Prostaglandina E2	Cistatinas
Ativador do plasminogénio	TNF- $\alpha$ , interferão
Fator ativador de plaquetas	MCP-1
Substância P	Anticorpos antibacterianas: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA
Ativador do plasminogénio inibidor-2	RANTES ( quimioattractor e ativador de macrófagos e linfócitos )
Calgranulina A (MRP-8)	Leucotrieno B4
Neopterin	Proteínas de fase aguda: a lactoferrina, transferrina, $\alpha$ 2-macroglobulina, $\alpha$ 1-proteinase inibidor, proteína C reativa
Péptidos intestinais vasoactivos	CD14
Neuroquinina A	Citocinas: IL - 1 $\alpha$ , IL - 1 $\beta$ , IL - 1ra , IL - 2 , IL - 6 , IL - 8

Adaptado de Oral Fluid- Based Biomarkers in Periodontal Disease- Part 2. Gingival Crevicular Fluid, 2014b

**Tabela 9-** Podutos de degradação de tecidos no FCG

Produtos de degradação de tecidos	
Laminina	Sulfato de condroitina-4
Osteopontin	Sulfato de condroitina-6
Osteocalcina	Ligações cruzadas de piridina (ICTP)
Calprotectina	Glicosaminoglicanos
Fragmentos de fibronectina	Osteonectina, ácido hialurónico e hidroxiprolina
Hemoglobina $\beta$ - peptídeos de cadeia	

Adaptado de Oral Fluid- Based Biomarkers in Periodontal Disease- Part 2. Gingival Crevicular Fluid, 2014

No entanto, apesar das suas vantagens, O GCF apresenta algumas desvantagens, a sua colheita é realizada pelos dentistas através de tiras de papel filtradas e requer uma amostra de todas as localizações dentárias de cada dente o que torna este procedimento para além de tecnicamente exigente, trabalhoso requerendo muito tempo. Para avaliação dos analitos é também caro por necessitar de uma avaliação individual de cada amostra em laboratório e requer equipamento para calibrar e medir os volumes dos fluidos que por sua vez são quantidades mínimas. Esta quantidade mínima de fluido gengival crevicular pode rondar por volta de 1 $\mu$ l podendo em muitos casos ser contaminado com sangue, saliva ou placa havendo um impacto na análise laboratorial (Miller et al., 2010).

Apesar dos problemas mencionados para a amostragem do fluido gengival crevicular AlRowis et. al (2014) salienta, com base nas investigações realizadas, que os vários marcadores estão presentes para detetar a presença, severidade e resposta aos tratamentos periodontais, no entanto, são necessários mais estudos para analisar a credibilidade desses indicadores o que poderá ajudar no desenvolvimento de testes de diagnóstico periodontal não invasivos.

Por outro lado, para além dos estudos realizados para o diagnóstico da doença periodontal através do fluido crevicular gengival, a saliva total é obtida mais facilmente, de forma mais rápida e com menos exigência técnica por parte do dentista. A saliva consegue fornecer uma avaliação mais global de uma doença particular ou o seu risco. Os biomarcadores salivares podem fornecer aos profissionais de saúde se existe alguma doença presente ou se há necessidade de tratamento podendo também refletir se o tratamento foi bem sucedido (Miller et al., 2010).

Num estudo realizado por Sexton et al. (2011), foi avaliado, longitudinalmente, os biomarcadores salivares para a periodontite em resposta aos tratamentos efetuados. Este estudo decorreu durante 6 meses em adultos com idade superior a 18 anos diagnosticado com periodontite crónica. A amostra do estudo envolveu 67 doentes, dos quais 33 receberam apenas instruções de higienização oral e 35 foram submetidos a alisamento radicular juntamente com instruções de higienização oral.

As amostras salivares foram coletadas e analisadas na semana 0, 16 e 28 procurando identificar 6 marcadores que estão envolvidos na inflamação, na degradação do tecido conjuntivo e na osteoclastose do osso alveolar: a interleucina-1b, interleucina-8, proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ), matriz metaloproteinase 8 (MMP-8), osteoprotegerina (OPG) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (Sexton et al., 2011).

A interleucina-8 possui um papel importante como mediador de resposta inflamatória. A interleucina-1b, uma citocina pro inflamatória, induz a expressão de vários genes que podem contribuir para a ativação dos osteoclastos resultando em reabsorção óssea. Esta forma de reabsorção óssea é o mesmo processo que ocorre com maior frequência na doença periodontal, podendo esta proteína ser sintetizada a nível do ligamento periodontal pelas células do tecido conjuntivo ou pelo infiltrado de leucócitos (Miller et al., 2010).

A proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1alfa) é secretada por células inflamatórias, ativando os osteoclastos através da estimulação de monócitos e das células progenitoras de osteoclastos, sendo responsável principalmente pela adesão e migração celular (Miller et al., 2010).

A proteína matriz metaloproteinase (MMP) é a enzima encarregue primordialmente na degradação extracelular da matriz de colagénio que é libertada na fase aguda da periodontite por leucócitos polimorfonucleares. Esta enzima é responsável pela destruição de colagénio tipo I e tipo II, sendo considerada a enzima mais potente. A MMP-8, uma enzima pertencente a família das proteínas da matriz metaloproteínas também designada de Colagenase-2 desempenha um papel importante na doença periodontal sendo considerada uma enzima proteolítica específica que é secretada pelos neutrófilos e macrófagos. Uma vez que a MMP é considerada uma das mais potentes proteinases, esta característica torna o papel do MMP-8 muito importante na patogénese da doença periodontal. Os seus níveis elevados revelam que existe atividade de degradação de colagénio em doentes com periodontite uma vez que níveis salivares de MMP-8 foram encontradas com valores elevados em paciente com



periodontite, o que nos indica que MMP-8 não é apenas libertada quando existe tecidos afetados, mas também é secretada na saliva e fluido gengival crevicular no caso de doenças orais na saliva devido a permeabilidade do epitélio sulcular. É de salientar ainda certas bactérias anaeróbicas específicas da doença periodontal, como *P.gingivalis* ou *Treponema denticola*, em associação com MMP-8 poderá prever o estado da doença periodontal (AlMoharib et al., 2014).

Por fim, a glicoproteína osteoprotegerina (OPG) secretada principalmente por osteoblastos e pelas células do estroma da medula óssea, pertence a família dos recetores do fator de necrose tumoral (TNF) sendo responsável pela inibição da diferenciação dos osteoclastos e da sua atividade, promovendo a reabsorção óssea. Nalguns estudos, concentrações de OPG foram encontradas com níveis elevados em doentes com doença periodontal. A nível do TNF, uma das citocinas proinamatórias que intervém no controlo da osteoclastogénese, no caso da TNF- $\alpha$  tem vindo a ser encontrada sobre expressa na periodontite sendo também responsável pela reabsorção do osso alveolar durante a doença periodontal (AlMoharib et al., 2014; AlRows et al., 2014; Tabari, Azadmehr, Tabrizi, Hamissi, & Ghaedi, 2013).

A nível dos biomarcadores mencionados foram detetados e analisados em todas as amostras salivares dos dois grupos de doentes submetidos a terapia, na semana 0, 16 e 28 (Sexton et al., 2011).

Os níveis de MIP-1 $\alpha$  e IL-8 não variaram da semana 0 para a semana 16 ou 28 em resposta aos tratamentos (Sexton et al., 2011).

A glicoproteína osteoprotegerina e TNF- $\alpha$  revelaram variações significativas independentemente do grupo de tratamento, sendo no caso da osteoprotegerina com variações elevadas na semana 28 desde a semana 0, e o TNF- $\alpha$  com variações elevadas em ambas as semanas desde a semana 0 (Sexton et al., 2011)

No caso do IL-8, também revelou variações elevadas desde a semana 0 em ambas as visitas no grupo de doentes submetidos a alisamento radicular conjuntamente com instruções de higienização oral, havendo no grupo de doentes submetido apenas a instruções de higienização oral variações elevadas somente na segunda visita, ou seja, na semana 28 (Sexton et al., 2011).

No caso do biomarcador MMP-8, no grupo de doentes submetidos a alisamento radicular juntamente com instruções de higienização oral, a sua concentração diminuiu em ambas as visitas na semana 16 e 28 desde a semana 0, não havendo variações no

grupo de doentes submetidos apenas a instruções de higienização oral (Sexton et al., 2011).

Neste estudo é de salientar que os doentes foram avaliados de forma a procurar uma correlação entre a resposta a terapia e os níveis de biomarcadores, daqueles que não demonstraram progresso no tratamento (Sexton et al., 2011).

Os biomarcadores, OPG, MMP-8 e MIP-1 $\alpha$ , apresentaram concentrações significativamente baixas nos doentes que demonstraram progresso no tratamento em comparação aos que não progrediram. No entanto, os seus níveis de OPG e MIP-1 $\alpha$  estão correlacionados com a atividade osteoclástica e remodelação óssea que poderão não estar presentes durante a doença periodontal o que poderá produzir resultados falsos (Sexton et al., 2011).

O IL-1 $\beta$  é outro biomarcador duvidoso, apesar de relacionada com a doença periodontal, ela poderá se encontrar em concentrações elevadas em caso de inflamação gengival ou periodontal sendo a sua sensibilidade perante a doença periodontal insuficiente para monitorizar esta doença individualmente (Sexton et al., 2011).

Este autor considera o OPG e MMP-8 são bons biomarcadores salivares na resposta ao tratamento periodontal, salientando que o MMP-8 é o melhor biomarcador para demonstrar a resposta a terapia. Este biomarcador através de vários outros estudos também já demonstrou a sua eficácia como um indicador de doença periodontal e degradação de tecido conectivo o que reforça o seu potencial como biomarcador salivar importante no diagnóstico da periodontite (Sexton et al, 2011).

Segundo o autor do estudo, Sexton et al. (2011), foi possível através dos resultados obtidos, demonstrar através dos biomarcadores salivares, o estado periodontal nos doentes que receberam alisamento radicular conjuntamente com instruções de higiene oral. Acrescenta-se também que estes biomarcadores salivares refletiram a resposta periodontal em função da terapia obtida. Desta forma, através deste estudo, os biomarcadores salivares IL-1 $\beta$ , MMP-8, OPG e MIP- $\alpha$ , permitiram determinar a severidade da doença periodontal como da sua resposta a terapia obtida o que nos indica que os biomarcadores salivares para a periodontite poderão ter utilidade na monitorização da doença periodontal e também a nível da sua resposta ao tratamento providenciando no futuro análises salivares de biomarcadores no diagnóstico da doença periodontal.

Num outro estudo realizado por Tabari et al. (2013) foi avaliado o rácio de dois biomarcadores no diagnóstico de periodontite de não fumadores, a utilidade do ativador

de recetor do fator kappa B nuclear ligand solúvel (RANKLs) e a osteoprotegerina (OPG).

O sistema de ativador de recetor de kappa nuclear B (RANK) e RANK ligand (RANKL) e OPG são responsáveis pela ativação de osteoclastos e na regulação de reabsorção óssea, sendo o RANKL produzido por várias células como fibroblastos, osteoblastos, células T e B ativadas e também pela medula óssea estromal. Este biomarcador intervém na osteoclastogénese e responsabiliza-se pela diferenciação de osteoclastos progenitores e na ativação de osteoclastos maduros (Tabari et al., 2013).

Este estudo envolveu 55 doentes dos quais 25 foram diagnosticados com periodontite crónica e 25 sem sintomas ou história de periodontite e perda óssea (Tabari et al., 2013).

Os níveis salivares de RANKLs e o rácio de RANKLs/OPG foram significativamente altas em doentes com periodontite enquanto que os níveis de OPG não revelou grandes diferenças entre o grupo de controlo e o grupo com periodontite o que também se confirmou nos estudos de outros autores. A razão pelo qual não houve diferenças significativas para o OPG poderá dever-se ao facto deste ser produzido por fontes diferentes, sendo a sua origem quase igual tanto em estágios de saúde como de doença. Ela também é mais afetada em fumadores e diabéticos do que na doença periodontal o que poderá dificultar a sua variação em diferentes fases da periodontite (Tabari et al., 2013).

Os parâmetros periodontais como a perda de inserção clínica e o índice de placa demonstraram correlações positivas com os níveis salivares de RANKLs e o rácio de RANKLs/OPG. No entanto, este autor salienta que houve estudos com resultados controversos a nível das concentrações de RANKL e OPG mas em concordância com o rácio RANKLs/OPG em localizações afectadas por periodontite (Tabari et al., 2013).

Com este estudo foi possível demonstrar que existe a possibilidade de utilizar o rácio dos biomarcadores salivares RANKLs/OPG na monitorização e diagnóstico da periodontite, no entanto, serão necessários mais estudos e com amostras maiores para obter validade no diagnóstico periodontal (Tabari et al., 2013).

### 3. Cárie Dentária

A cárie dentária é uma doença infecciosa multifatorial que permanece como um grave problema de saúde no mundo com uma taxa de prevalência de mais de 40% e uma tendência crescente em crianças e, uma taxa de prevalência por volta de 90% no caso de adultos o que tem vindo a aumentar especialmente em populações com níveis socioeconómicos mais baixos na Europa (Guo & Shi, 2013; Zhao, Blackburn, Chin, & Srinivasan, 2014).

Apesar da cárie dentária ser uma doença com largas medidas preventivas e com uma redução drástica da sua taxa ao longo da última década, persiste como a doença crónica mais prevalente globalmente que afeta 60% a 90% de crianças e adultos. A nível das crianças esta doença é considerada cinco vezes mais prevalente em relação à asma que é a próxima doença mais prevalente (Guo & Shi, 2013; Zhao et al., 2014).

A cárie dentária é causada por interações complexas multifatoriais entre as bactérias produtoras de ácido, hidratos de carbono fermentáveis e fatores do hospedeiro. A sua patogénese envolve a desmineralização do esmalte por parte das bactérias produtoras de ácido e a destruição do material orgânico, o que resulta em cavitação. A proliferação destas bactérias acidogénicas é favorecida através de perturbações biológicas e ambientais como o aumento da frequência do consumo de hidratos de carbono e o pH salivar baixo. Dentro das bactérias acidogénicas o *streptococcus mutans* tem vindo a ser frequentemente associado com a iniciação e progressão da cárie dentária e considerada como o agente principal para o desenvolvimento desta doença infecciosa (Guo & Shi, 2013; Zhao et al., 2014).

A saliva é um fluido rico em fatores do hospedeiro que lhe confere a capacidade de modular o processo da cárie dentária. Devido a esta particularidade, tem havido avanços tecnológicos para auxiliar a caracterização proteica e peptídica com a identificação de 1444 proteínas e 11893 péptidos, dos quais envolvem diferentes classes funcionais como a resposta a estímulos e *stress*, funções antioxidantes, funções catalíticas e reguladores enzimáticos (Zhao et al., 2014).

Vários componentes salivares foram estudados com o intuito de encontrar uma associação com a cárie dentária, havendo alguns componentes com fraca associação e outros com associações ambíguas. No entanto, a saliva é apropriado para a monitorização de bactérias uma vez que esta sobrevive no fluido oral podendo utilizar

este para o seu crescimento, como por exemplo os níveis elevados de *streptococcus mutans* e *lactobacillus* na saliva foram associados a um aumento da prevalência da cárie dentária. Acrescenta-se ainda que com a existência de cáries radiculares e certas espécies bacterianas podem refletir a sua presença na placa dentária e nas bolsas periodontais (Greabu et al., 2009; Zhao et al., 2014).

Num estudo realizado por Zhao et al, (2014) foi avaliado em 40 crianças com idades compreendidas entre os 6 e os 12 anos, o potencial dos biomarcadores salivares solúveis, sTLR-2, recetor do tipo Toll, e o seu co-recetor, sCD14, na atividade da cárie dentária.

Os recetor tipo Toll (TLR) são responsáveis pelo reconhecimento de vários padrões de microorganismos patogénicos, existindo atualmente, 13 TLR de mamíferos e muitos ligandos. Os TLR desencadeiam respostas para a prevenção e controlo da infeção criando barreiras que fazem a amostragem constante do meio ambiente. Estes recetores podem exercer a sua função individualmente ou em conjunto com coreceptores específicos no reconhecimento de padrões microbianos como no caso do co recetor CD14 que em associação com TLR-2, permite o reconhecimento de peptidoglicanos de bactérias gram-positivas e, em associação com TLR-4, permite o reconhecimento de lipopolissacarido de bactérias gram-negativas. Estes dois recetores, TLR-2 e TLR-4 são expressos pelos odontoblastos em dentes saudáveis. Quando ocorre a estimulação de odontoblastos e estimulação de células com uma parede celular constituído por componentes das bactérias Gram-positivas, ocorre a libertação de citocinas e quimiocinas de forma dependente a nível do TLR-2. O TLR-2 também possui a capacidade de reconhecer o ácido libertado pela bactéria *Streptococcus mutans*, e tem vindo a demonstrar elevadas concentrações salivares na presença de cáries ativas o que poderá tornar este um biomarcador importante na atividade da cárie dentária (Zhao et al., 2014).

Das 40 crianças submetidas ao estudo do autor Zhao et. al (2014), 20 foram diagnosticados com cárie ativa e os restantes 20 sem a presença de cárie dentária na cavidade oral.

Foi observado no grupo de crianças com cáries ativas, uma concentração significativa de sTLR-2 em comparação ao grupo com ausência de cárie dentária o que reflete que este biomarcador salivar possui o potencial para a avaliação da atividade da cárie dentária.

Uma vez que os TRL nas células hospedeiras induzem a secreção de citocinas, IL-1beta foi encontrada na saliva mas sem diferenças muito significativas entre os dois grupos (Zhao et al., 2014).

Em relação ao co-receptor sCD14, as concentrações obtidas no estudo foram ambíguas em ambos os grupos (Zhao et al., 2014).

Num estudo recente realizado por Cogulu et al. (2015) foi avaliado a associação da interleucina IL-1 $\beta$ , IL-1, o recetor antagonista (IL-1ra) e IL-10 com as cáries dentárias. Neste estudo foram obtidas amostras salivares e sanguíneas de 108 crianças com idades compreendidas entre os seis e os doze anos.

Como já foi referido anteriormente, as citocinas desempenham um papel importante na ativação de um grupo extenso de moléculas como no caso de monócitos em macrófagos, sendo considerado mediadores de infeção, inflamação e da resposta imunitária. No entanto a nível da cárie dentária, o seu papel ainda não está esclarecido, mas por outro lado, os componentes da bactéria *S.mutans* tem vindo a mostrar evidência na estimulação da produção de citocinas (Cogulu et al., 2015).

No estudo do autor Cogulu et al. (2015), verificou-se que não houve uma correlação significativa entre as cáries e os níveis salivares e sanguíneas das citocinas. No entanto bactéria *S.mutans* revelou uma correlação positiva com o biomarcador salivar IL-1beta, e no caso do IL-1ra, demonstrou uma correlação inversa. Devido à correlação inversa, este autor afirma que a bactéria *S.mutans* é fundamental na estimulação salivar de IL-1beta com a consequente inibição do biomarcador IL-1ra.

Como foi referido, as citocinas estão envolvidas na inflamação que demonstram evidências de atuação nas cáries dentárias, contribuindo para o seu início e progressão, no entanto, as citocinas envolvidas no estudo, IL-1beta, IL-1ra e IL-10, não correlacionaram entre as cáries dentárias e as concentrações salivares e sanguíneas (Cogulu et al., 2015).

### **III - Conclusão**

A saliva tem vindo a demonstrar a sua capacidade e utilidade no diagnóstico de doenças orais e sistémicas nos últimos anos. A abordagem não invasiva e segura, a sua colheita facilmente obtida e ainda económica, tornam este fluido altamente desejável para o diagnóstico e monitorização frequente de doenças. Desta forma, o diagnóstico salivar poderá ter um impacto significativo no futuro da medicina, servindo como uma alternativa de diagnóstico aos métodos tradicionais, como as análises ao sangue ou urina que por sua vez são métodos invasivos e desconfortáveis que muitas vezes são evitados pelos doentes o que influencia o seu estado de saúde.

A complexidade biológica da saliva e a sua composição rica em potenciais biomarcadores, correlacionam-se com certas doenças. Através dos avanços na tecnologia e no diagnóstico molecular foi possível identificar uma variedade de biomarcadores presentes em doenças sistémicas e orais, como o cancro da mama, doenças cardiovasculares, a doença periodontal, a cárie dentária, o cancro oral, doenças autoimunes, doenças infecciosas, entre outras. Salienta-se ainda que a saliva permite não só a deteção de doenças como a monitorização de níveis terapêuticos de medicamentos e deteção de drogas ilícitas.

Embora a saliva permita a deteção de indicadores de patologias, ainda se depara com algumas barreiras, como a necessidade de mais validação científica dos biomarcadores salivares e mais específicos para cada patologia, correlações significativas entre as biomoléculas no sangue e a saliva, a influência das variações circadianas da saliva e ainda a falta de métodos de deteção mais sensíveis. No entanto, apesar da necessidade de mais validação científica, nos estudos mencionados anteriormente, os resultados são promissores. Foi evidenciado a eficácia da saliva na identificação de certos indicadores de patologia, como também foram demonstradas correlações significativas para algumas patologias quando comparadas com o sangue, o que revela a possibilidade de identificar e monitorizar tanto doenças orais como sistémicas.

O diagnóstico salivar com o seu atual progresso, poderá torna-lo a chave para a monitorização de saúde oral e sistémica num futuro próximo e permitir uma deteção precoce de doenças através de um método simples, rápido e eficaz. O diagnóstico salivar poderá ajudar na qualidade de vida dos doentes como salvar vidas como no caso

do HIV, onde já é possível a sua detecção através da saliva e atualmente já existem dispositivos disponíveis para o público. O diagnóstico salivar poderá reservar um lugar importante no futuro da medicina dentária, com o início de um novo capítulo na história das ciências da saúde.



## IV- Bibliografia

- Abikshyeet, P., Ramesh, V., & Oza, N. (2012). Glucose estimation in the salivary secretion of diabetes mellitus patients, 149–154.
- Adriane, S., Moura, B. De, Rafael, F., & Iii, C. (2007). Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas : Uma Revisão de Literatura, 187–194.
- AlMoharib, H. S., AlMubarak, a., AlRowis, R., Geevarghese, a., Prethanath, R. S., & Anil, S. (2014). Oral Fluid Based Biomarkers in Periodontal Disease : Part 1 . Saliva. *Journal of International Oral Health*, 6(April), 95–103.
- AlRowis, R., AlMoharib, H. S., AlMubarak, A., Bhaskardoss, J., Prethanath, R. S., & Sukumaran, A. (2014). Oral Fluid-Based Biomarkers in Periodontal Disease – Part 2 . Gingival Crevicular Fluid, 6(March), 126–135.
- Arunkumar, S., Arunkumar, J. S., Burde, K. N., & Shakunthala, G. K. (2014). Developments in diagnostic applications of saliva in oral and systemic diseases- A comprehensive review, 3(3), 372–387.
- Balan, P., Babu, S. G., Sucheta, K. N., Shetty, S. R., Rangare, A. L., & Renita, L. (2014). Can saliva offer an advantage in monitoring of diabetes mellitus ? – A case control study, 6(4), 6–9. <http://doi.org/10.4317/jced.51386>
- Brinkmann, O., Kastratovic, D. a., Dimitrijevic, M. V., Konstantinovic, V. S., Jelovac, D. B., Antic, J., ... Wong, D. T. (2011). Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. *Oral Oncology*, 47(1), 51–55. <http://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.10.009>
- Castagnola, M., Picciotti, P. M., Messana, 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. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3272865&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Cheng, Y. L., Rees, T., & Wright, J. (2014). A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection, *3*(1), 1–10. <http://doi.org/10.1186/2001-1326-3-3>
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & Palo, E. F. De. (2007). Saliva specimen : A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation, *383*, 30–40. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
- Ching, K. H., Burbelo, P. D., Gonzalez-Begne, M., Roberts, M. E. P., Coca, a, Sanz, I., & Iadarola, M. J. (2011). Salivary anti-Ro60 and anti-Ro52 antibody profiles to diagnose Sjogren's Syndrome. *Journal of Dental Research*, *90*(4), 445–449. <http://doi.org/10.1177/0022034510390811>
- Cogulu, D., Onay, H., Ozdemir, Y., Aslan, G. I., Ozkinay, F., Kutukculer, N., & Eronat, C. (2015). Associations of interleukin ( IL ) -1 $\beta$  , IL-1 receptor antagonist , and IL-10 with dental caries, *57*(1), 31–36.
- Corstjens, P. L. A. M., Abrams, W. R., & Malamud, D. (2012). Detecting viruses by using salivary diagnostics, *29*(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- Deepa, T. & Thirrunavukkarasu, N. (2010). Saliva as a Potential Diagnostic Tool. *Indian Journal of Medical Sciences*, *64*(7), 293–306. <http://doi.org/10.4103/0019-5359.99854>
- Desai, G. S., & Mathews, S. T. (2014). Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance, *5*(6), 730–738. <http://doi.org/10.4239/wjd.v5.i6.730>
- Esser, Diederik Alvarez-Llamas, Gloria De Vries, Marcel P. Weening, Desiree Vonk, Roel J. Roelofsen, H. (2008). Sample stability and protein composition of saliva : Implications for Its Use as a Diagnostic Fluid, 1–8.

- Farnaud, S. J. C., Kosti, O., Getting, S. J., & Renshaw, D. (2010). Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *TheScientificWorldJournal*, 10, 434–456. <http://doi.org/10.1100/tsw.2010.38>
- Fernandez, O., Martin, R., Rovira, A., Llufrui, S., Vidal-Jordana, A., Fernandez-Sanchez, V. E., ... Montalban, X. (2014). Biomarkers in multiple sclerosis: an update for 2014. *Revista de Neurologia*, 58(12), 553–70. <http://doi.org/rn2014247> [pii]
- Foley, J. D., Sneed, J. D., Steinhubl, S. R., Kolasa, J., Ebersole, J. L., Lin, Y., ... Miller, C. S. (2012). Oral fluids that detect cardiovascular disease biomarkers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 114(2), 207–214. <http://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.03.003>
- Giannobile, W. V., McDevitt, J. T., Niedbala, R. S., & Malamud, D. (2011). Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Advances in Dental Research*, 23(4), 375–380. <http://doi.org/10.1177/0022034511420434>
- Goswami, Y., Mishra, R., Agrawal<sup>3</sup>, A. P., & Agrawal, L. a. (2015). Salivary Biomarkers-A Review of Powerful Diagnostic tool. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences Ver. VII*, 14(3), 2279–861. <http://doi.org/10.9790/0853-14378087>
- Greabu, M., Battino, M., Mohora, M., Totan, A., Didilescu, A., Spinu, T., ... Radulescu, R. (2009). Saliva – a diagnostic window to the body , both in health and in disease, 2(2), 124–132.
- Groschi, M. (2008). Current Status of Salivary Hormone Analysis, 1769, 1759–1769. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108910>
- Guo, L., & Shi, W. (2013). Salivary biomarkers for caries risk assessment. *Journal of the California Dental Association*, 41(2), 107–9, 112–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3825179&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Hu, S., Arellano, M., Boonthung, P., Wang, J., Zhou, H., Elashoff, D., ... Wong, D. T. (2010). Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery. *Clinical Cancer Research*, *14*(19), 6246–6252. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5037>.Salivary
- Janket, S., Meurman, J. H., Baird, a E., Qvarnström, M., Nuutinen, P., Ackerson, L. K., ... Van Dyke, T. E. (2010). Salivary immunoglobulins and prevalent coronary artery disease. *Journal of Dental Research*, *89*(4), 389–394. <http://doi.org/10.1177/0022034509359884>
- Kim, J. J., Kim, C. J., & Camargo, P. M. (2013). Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. *Journal of the California Dental Association*, *41*(2), 119–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3629836&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Laidi, F., Bouziane, A., Lakhdar, A., Khabouze, S., Rhrab, B., & Zaoui, F. (2014). Significant Correlation between Salivary and Serum Ca 15-3 in Healthy Women and Breast Cancer Patients, *15*, 4659–4662.
- Laidi, Fatna Bouziane, Amal Lakhdar, Amina Khabouze, Samira Rhrab, Brahim Zaoui, F. (2014). Salivary expression of soluble HER2 in breast cancer patients with positive and negative HER2 status, 1285–1289.
- Lee, Y. & Wong, D. T. (2010). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases, *22*(4), 241–248.
- Macedo, D & Nunes, L. (2013). Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: potential and limitations. *J Bras Patol Med Lab*, *49*(50), 247–255.
- Maeshima, E., Koshiba, H., Furukawa, K., Maeshima, S., & Sakamoto, W. (2014). Residual Salivary Secretion Ability May Be a Useful Marker for Differential Diagnosis in Autoimmune Diseases. *Disease Markers*, *2014*, 1–5. <http://doi.org/10.1155/2014/534261>

- Malamud, D. & Isaac, R. (2012). Saliva as a Diagnostic Fluid, *55*(1), 159–178. <http://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.004>. Saliva
- Malathi, N., Mythili, S., & Vasanthi, H. R. (2014). Salivary Diagnostics : A Brief Review, *2014*.
- Malon, R. S. P., Sadir, S., Balakrishnan, M., & Córcoles, E. P. (2014). Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical Diagnostics. *BioMed Research International*, *2014*(i), 1–20. <http://doi.org/10.1155/2014/962903>
- Martí-álamo, S., Mancheño-franch, A., Marzal-gamarra, C., & Carlos-fabuel, L. (2012). Saliva as a diagnostic fluid . Literature review, *4*(4). <http://doi.org/10.4317/jced.50865>
- Miller, C. S., Foley, J. D., Bailey, A. L., Campell, C. L., Humphries, R. L., Christodoulides, N., ... McDevitt, J. T. (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in Medicine*, *4*(1), 171–189. <http://doi.org/10.2217/bmm.09.68>
- Minagar, A., Adamashvili, I., Kelley, R. E., Gonzalez-Toledo, E., McLarty, J., & Smith, S. J. (2007). Saliva soluble HLA as a potential marker of response to interferon-beta 1a in multiple sclerosis: a preliminary study. *Journal of Neuroinflammation*, *4*, 16. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-4-16>
- Monteiro, L., Amaral, J., Vizcaíno, J., & Lopes, C. (2014). A clinical-pathological and survival study of oral squamous cell carcinomas from a population of the north of Portugal, *19*(2), 120–126. <http://doi.org/10.4317/medoral.19090>
- Mv, M. A. (2013). Biomarcadores de câncer oral en saliva, (1), 293–302.
- Patel, R., & Shahane, A. (2014). The epidemiology of Sjögren’s syndrome. *Clinical Epidemiology*, *6*(1), 247–255. <http://doi.org/10.2147/CLEP.S47399>
- Pesaro, E., Campos, P., Katz, M., Corrêa, T., & Knobel, E. (2008). Síndromes Coronarianas Agudas : Tratamento e Estratifi cação de Risco. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, *20*(2), 197–204.

- Pfaffe, T., Cooper-white, J., Beyerlein, P., Kostner, K., & Punyadeera, C. (2011). Diagnostic Potential of Saliva : Current State and Future Applications CONTENT : SUMMARY ;, 687. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>
- Piérard, L. a. (2007). ST elevation after myocardial infarction: what does it mean? *Heart (British Cardiac Society)*, 93(11), 1329–1330. <http://doi.org/10.1136/hrt.2007.119131>
- Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J., & Indrak, K. (2009). Saliva as a diagnostic medium. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 153(2), 103–110.
- Qvarnstrom, M., Janket, S., Jones, J.A., Nuutinem, P., Baired , A.E., Nunn, M.E., Van Dyke, T.E., Meurman, J. H. (2010). Salivary Lysozyme and Prevalent Hypertension, 87(5), 480–484.
- Ravindran, R., & Deepa, M. G. (2012). SALIVARY TUMOUR MARKERS IN ORAL CANCER : BRIEF REVIEW, 2(2), 238–244.
- Satish, B. N. V. S., Srikala, P., Maharudrappa, B., Awanti, S. M., Kumar, P., & Hugar, D. (2014). Saliva : A tool in assessing glucose levels in Diabetes Mellitus, 6(October 2013), 114–117.
- Segal, A. & Wong, D. T. (2009). Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better, 12(Suppl 1), 22–29. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0579.2007.00477.x.Salivary>
- Sexton, W., Lin, Y., Kryscio, R. . J., Dawson III, D. . R., Ebersole, J. . L., & Miller, C. . S. (2011). Salivary Biomarkers of Periodontal Disease in Response to Treatment, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>
- Spielmann, N., & Wong, D. T. (2012). Saliva : diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis*, 17(4), 345–354. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x.Saliva>
- Tabari, Z. A., Azadmehr, A., Tabrizi, M. A. A., Hamissi, J., & Ghaedi, F. B. (2013). Salivary soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin

- ratio in periodontal disease and health. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 43(5), 227–32. <http://doi.org/10.5051/jpis.2013.43.5.227>
- Wang, J., Liang, Y., Wang, Y., Cui, J., Liu, M., Du, W., & Xu, Y. (2013). Computational Prediction of Human Salivary Proteins from Blood Circulation and Application to Diagnostic Biomarker Identification, 8(11), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0080211>
- Wong, D. T. W., Melvin, J. E., & Baum, B.J. Yates III, J. . S. S. (2011). Scientific Frontiers: Emerging Technologies for Salivary Diagnostics, 360–368. <http://doi.org/10.1177/0022034511420433>
- Wong, D T. Garon, E. Lee, J. M. (2010). Salivary diagnostics, 12(3), 206–211. <http://doi.org/10.1111/j.1601-6343.2009.01454.x.Salivary>
- Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, T. W. (2013). Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities, 26(4), 781–791. <http://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>
- Zhang, Y., Sun, J., Lin, C., Abemayor, E., Wang, M. B., & Tw, D. (2014). The Emerging Landscape of Salivary Diagnostics, 13.
- Zhao, A., Blackburn, C., Chin, J., & Srinivasan, M. (2014). Soluble toll like receptor 2 (TLR-2) is increased in saliva of children with dental caries. *BMC Oral Health*, 14(1), 108. <http://doi.org/10.1186/1472-6831-14-108>
- Zheng, H., Li, R., Zhang, J., Zhou, S., Ma, Q., Zhou, Y., ... Lin, J. (2014). Salivary biomarkers indicate obstructive sleep apnea patients with cardiovascular diseases. *Scientific Reports*, 4, 7046. <http://doi.org/10.1038/srep07046>
- Zolotukhin. S. (2014). Metabolic hormones in saliva: origins and functions. *Changes*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>