



CATÓLICA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

AVALIAÇÃO DA SAÚDE ORAL E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL TOTAL DE PROTEÍNAS DA SALIVA (SALIVAPRINT) – VARIAÇÃO COM A IDADE E GÉNERO

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para
obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Marta Sofia Moita André

Viseu, 2019



CATÓLICA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

AVALIAÇÃO DA SAÚDE ORAL E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL TOTAL DE PROTEÍNAS DA SALIVA (SALIVAPRINT) – VARIAÇÃO COM A IDADE E GÉNERO

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção do
grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Marta Sofia Moita André

Orientador: Professor Doutor Nuno Rosa

Coorientador: Professor Doutor Nélio Veiga

Viseu, 2019

Epígrafe

*Não desista.
Geralmente é a última chave no chaveiro que abre a porta.*
(Paulo Coelho)

Dedicatória

À mãe, ao pai e à mana sempre!
Foram eles que me trouxeram até aqui!

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Rosa, orientador deste projeto, pelo grande suporte, pelo ensinamento na forma e organização de pensamento, pela ajuda e apoio incondicionais, pela calma no desespero, pela paciência inesgotável e boa disposição. Não é de agora que aprendo imenso consigo.

Ao Professor Doutor Nélio Veiga, coorientador deste projeto, pelo contributo para esta investigação e pela sua constante participação amável ao longo de todo o meu percurso.

À Professora Doutora Marlene Barros e à Professora Doutora Maria José Correia, por uma vez mais, estarem presentes no meu desenvolvimento académico.

À Mónica, ao Eduardo e à Bruna, por me ouvirem, aturarem, ajudarem e motivarem sempre que precisei e de uma forma tão carinhosa e incansável. Sem vocês, nada disto teria sido possível. São incríveis!

À Diana e à Bibiana que também cederam dos seus tempos para me ajudar.

A todos os professores, funcionários, amigos, colegas e conhecidos, ao Reboot e à Sofia pela voluntária, cooperante e paciente participação neste estudo.

Aos meus pais, por permitirem e apoiarem a escolha deste caminho, por fazerem tudo o que vos é possível e impossível para que torne os meus sonhos realidade, por acreditarem em mim mais do que eu, pela educação e valores que me transmitiram e por me fazerem querer ser melhor todos os dias. Obrigada!

À minha irmã, cuidadora de sempre, por nunca desistir de mim, por apoiar e acompanhar todas as minhas caminhadas, por tornar o longe perto, pela preocupação e motivação permanentes, pela paciência e dedicação também aqui, mas na vida. Os sucessos de uma vão ser sempre das duas.

À avó das piquenas.

Ao Ricardo, imenso, pelo amor, gestos de carinho e paciência, para o meu mau feitio da época. Pela preocupação e dedicação para que eu perdesse o

mínimo tempo possível. Pelo companheirismo. Por me fazeres rir. Por nunca me teres deixado desistir, foste um verdadeiro suporte!

Ao meu binómio Rodrigo, pela boa amizade e pelas compreensões mútuas, pela calma e serenidade que sempre me transmitiu. Foste o parceiro desta jornada.

À Sarah e à Joaquina por tudo, a amizade não é um terço de nós, as confissões, os desabafos, as cusquices, o apoio, compreensão e motivação. Obrigada por me encaminharem sempre!

Ao Miguel, pelo grande amigo que é e por tudo o que vivemos estes anos.

À Sofia, pela amizade incansável, pelas explicações, pelas preocupações, pelas conversas. Foste o meu anjo da guarda durante todo este percurso.

À coelha, já nem lhe chamo amizade, pelas palavras certas nos momentos certos, por me distrair no pior e me obrigar a concentrar para o melhor. Pelos jantares antidepressivos e acreditares sempre em mim.

À Babita, por tudo, por estares sempre presente, por te preocupares, por ajudares, por ouvires, por fazeres tanto e ainda sorrir no fim. És um ser tão bonito.

À Qicca em que é que ajudaste mesmo? "...lutaste tanto por este curso, agora vais fazer o fim exatamente com a mesma vontade do início." Obrigada de sempre

Aos afilhado, filhados e lhados, foram o meu combustível aqui.

Ao Magnum, à Associação e a tudo o que implicaram, fizeram-me e viram-me crescer tanto. Foi incrível!

A todos os professores, funcionários e colegas que se incluíram no meu percurso e me permitem levar um bocadinho deles comigo para a vida.

À Universidade Católica Portuguesa- Centro Regional de Viseu por me ter proporcionado estes anos fantásticos, fui tão feliz aqui!

Resumo

A saliva tem sido explorada como um fluido de diagnóstico precoce e para monitorização de patologias, tanto orais como sistémicas. No entanto, as estratégias de diagnóstico utilizadas continuam a ser baseadas na identificação de algumas moléculas, muitas vezes inespecíficas de determinada situação. Urge, pois, desenvolver estratégias que permitam avaliar o cenário molecular completo. O SalivaPrint é uma dessas estratégias. Contudo, para que esta abordagem possa ser utilizada no diagnóstico há que padronizar os perfis obtidos e identificar os fatores que afetam este perfil, tais como a idade, o género e a condição oral dos indivíduos. Nesse sentido, este trabalho tem como objetivos: 1. Verificar se há variação do SalivaPrint com a idade e com o género; 2. Verificar se há variação do SalivaPrint com a saúde oral; 3. Verificar se há relação dos parâmetros físico-químicos da saliva com os índices de saúde oral.

Foi recolhida saliva não estimulada de indivíduos do género feminino e masculino, saudáveis sistémicos e orais dos 7 aos 50, e um grupo dos 25-50 anos com patologia oral. Foi feita a determinação dos fatores físico-químicos, e dos perfis totais de proteínas por eletroforese capilar em micro-chips.

Verificou-se que existem alterações do SalivaPrint com a idade e com a saúde oral mas não com o género. A concentração total de proteína não difere, com o género, no entanto difere com a idade. O pH e o fluxo, não diferem, em indivíduos com patologia periodontal nem com a presença de cárie.

Uma vez que se observaram diferenças no SalivaPrint de pessoas saudáveis, é importante ter esse facto em conta na comparação com indivíduos doentes para isolar o efeito da doença dos efeitos de outros parâmetros.

Este tipo de trabalhos, é essencial para encontrar formas menos invasivas de diagnóstico que tenham em conta toda a variabilidade molecular e fisiológica do indivíduo.

Palavras-chave: Diagnóstico; Saúde oral; Proteínas; Eletroforese; Idade; Género

Abstract

Saliva is nowadays used to allow early diagnose and monitorization of both oral and systemic diseases.

However, the diagnostic strategies used today are based on the identification of some molecules, often unspecific of a given condition. Therefore, it's imperative to develop strategies that can assess the complete molecular scenario. SalivaPrint is one such strategies. However, for this approach to be used in the diagnosis, it is necessary to standardize the profiles obtained and to identify the factors that affect this profile, such as age, gender and the oral condition of the individuals. Therefore, this work aims to: 1. Verify if there's any variation of SalivaPrint related to age or gender; 2. Verify if there's any variation of SalivaPrint related to oral health; 3. Verify is there's any relation between saliva physical and chemical parameters and the oral health indexes.

Unstimulated whole saliva was collected from male and female individuals, systemic and orally healthy, aged between 7 and 50 and also in a group of oral disease bearers, aged between 25 and 50 years. Physical and chemical factors were determined, and total protein profile were established by using capillary electrophoresis in micro-chips.

It was verified that there are changes in SalivaPrint related to age and oral health but not with gender. It was found that total protein concentration does not varies with gender however it varies with age. pH and flow do not vary either with periodontal disease neither the presence of tooth decay.

Differences were observed in saliva protein profiles of healthy individuals. That is important to be considered when comparing to unhealthy individuals in order to isolate the disease effects from the effects of other parameters.

This type of work it's essential to find less invasive forms of diagnose that take into account all the molecular and physiological variability.

Key words: Diagnostics, Oral health, Proteins, Electrophoresis, Age, Gender

Índice

I. INTRODUÇÃO.....	7
1. Saúde oral.....	3
1.1 Cárie Dentária.....	3
1.2 Doença periodontal.....	5
1.3 Saúde oral vs. saúde sistémica.....	6
2. Saliva como meio de diagnóstico.....	8
2.1. Técnicas para determinação de proteínas na saliva.....	10
2.1.1 Diagnóstico molecular – O SalivaPrint.....	12
2.2. Variação da composição da saliva com a idade e género.....	14
3. Objetivos.....	15
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
1. Aprovação ética e consentimento informado.....	19
2. Caracterização do tipo de estudo.....	19
3. Caracterização da população e da amostra.....	19
3.1 Dimensão da amostra.....	20
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	21
4. Recolha de dados clínicos.....	23
4.1 Avaliação da saúde oral.....	24
4.1.1 Calibração.....	26
5. Recolha de amostras de saliva.....	27
6. Determinação e análise do perfil de proteínas da saliva (Saliva Print).....	28
7. Avaliação da relação do SalivaPrint com a idade, género e saúde oral.	31
8. Análise estatística dos resultados.....	31
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
1. Caracterização da população.....	35
2. Caracterização do <i>status</i> de saúde oral da população.....	37
2.1 Índice CPOD.....	37
2.2 Status Periodontal.....	38
3 Caracterização da saliva através de parâmetros físico-químicos.....	40
3.1 Concentração total de proteína.....	40
3.2 Fluxo.....	45
3.3 Concentração de proteína total vs PSR vs CPOD vs pH vs fluxo salivar	

4	Análise do perfil total de proteínas – SalivaPrint com idade, género e saúde oral	49
4.1.	Varição do SalivaPrint com a idade	50
4.2	Varição do género	52
4.2.1	Faixa etária menor que 13 anos	52
4.2.2	Faixa etária entre os 13 e os 24 anos	53
4.2.3	Faixa etária entre os 25 e os 50 anos	54
4.3	Limitações do estudo	57
IV.	CONCLUSÃO	59
V.	BIBLIOGRAFIA	63
VI.	ANEXOS	73

Índice de figuras

Figura 1- Imagem adaptada de (28): Representação esquemática de moléculas associadas à doença periodontal.	6
Figura 2- Critérios de inclusão e exclusão G1, G2, G3, G4 e G5.....	22
Figura 3- Critérios de inclusão e exclusão G6.....	23
Figura 4- Imagem ilustrativa do equipamento Experion™ Automated Electrophoresis System (Biorad) adaptada de (69).....	28
Figura 5- Perfil exemplo resultante da análise do algoritmo SalivaPrint Toolkit	30
<i>Figura 6- Distribuição de indivíduos da amostra por género (%).....</i>	<i>35</i>
Figura 7- Divisão da amostra total em intervalos de faixa etária	36
<i>Figura 8- Distribuição das idades por grupo de faixa etária</i>	<i>37</i>
Figura 9- Distribuição do número de cáries na amostra total (%).....	38
Figura 10- Distribuição do diagnóstico periodontal na amostra total e % correspondente	39
<i>Figura 11- Distribuição dos valores do índice de PSR da amostra total e % correspondente</i>	<i>40</i>
Figura 12- Comparações múltiplas da concentração da proteína total nos diferentes grupos de faixa etária G1, G2 e (G3 + G6); * e ° outliers.....	41
Figura 13- Comparações múltiplas da concentração da proteína total nos diferentes grupos de faixa etária G1, G2 e G3; * e ° outliers.....	43
Figura 14- Comparações múltiplas da concentração da proteína total nos grupos para a mesma faixa etária, sem patologia oral (G3) e com patologia oral (G6)	44
Figura 15- Dispersão dos valores do fluxo para os grupos G3 e G6; * e ° outliers	46
Figura 16- Perfis Médios dos grupos G1, G2 e G3	50
Figura 17- Distribuição dos valores médios do Pico 2 de cada grupo, G1, G2 e G3. ° outliers.....	51
Figura 18- Distribuição dos valores médios do Pico 7 para cada grupo, G1, G2 e G3. ° outliers.....	52
Figura 19- Perfis Médios dos grupos G1F e G1M.....	53
Figura 20- Perfis Médios dos grupos G2F e G2M.....	54
Figura 21- Perfis Médios dos grupos G3F e G3M.....	54
Figura 22- Perfis Médios dos grupos G4 e G5	55
Figura 23- Perfis Médios dos grupos G3 e G6	56
Figura 24- Distribuição dos valores médios do Pico 2 para cada grupo, G3 e G6. ° outliers	57

Índice de tabelas

Tabela 1- Caracterização dos grupos de estudo.....	20
Tabela 2- Caracterização da dimensão da amostra.....	21
Tabela 3- Critérios utilizados para determinação do Índice CPOD	25
Tabela 4- Tabela representativa dos critérios utilizados para preenchimento do PSR.....	26
Tabela 5- índice de CPOD correspondente à amostra total e % correspondente	38
Tabela 6- Correlação de todas as variáveis, concentração de proteína total, PSR, CPOD e pH no grupo com patologia oral G6	49

Abreviaturas

1-DE- eletroforese unidimensional bidimensional

2-DE- eletroforese bidimensional

CPOD- Dentes cariados perdidos e obturados

DNT- Doenças não transmissíveis

FDI- World Dental Federation

IMC- Índice de massa corporal

kDa- Kilodaltons

MS- Espectrometria de massa

MW- Pesos moleculares

OMS- Organização mundial de saúde

PSR- Periodontal Screening and Recording Index

SDS-PAGE- Eletroforese gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

I. INTRODUÇÃO

Introdução

1. Saúde oral

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a saúde oral como a ausência de dor oral e/ou facial, cancro da cabeça e pescoço, infecção oral, doença periodontal, cárie dentária, perda dentária, bem como outras patologias e distúrbios que possam limitar a capacidade de mastigar, sorrir, falar e o bem-estar psicossocial(1).

A FDI (World Dental Federation) defende que a saúde oral é uma componente essencial da saúde em geral e que um índice elevado de saúde oral é um direito humano fundamental. O papel da medicina dentária é auxiliar a população e os responsáveis políticos a melhorar a saúde, através de um elevado índice de saúde oral (2). “A saúde oral é multifacetada e inclui a capacidade de falar, sorrir, cheirar, provar, tocar, mastigar, engolir e transmitir uma série de emoções através de expressões faciais com confiança e sem dor, desconforto e doença do complexo craniofacial” (3).

Duas das doenças orais com maior impacto na disrupção do equilíbrio estabelecido e, potencialmente, na saúde sistémica são as cáries dentárias e as doenças periodontais.

1.1 Cárie Dentária

Um estudo recentemente publicado pela OMS revela que as cáries dentárias são a doença não contagiosa mais comum em todo o mundo, afetando a maioria dos adultos e 60 a 90% das crianças em idade escolar, causando milhões de faltas escolares anualmente (4).

A cárie dentária caracteriza-se pela destruição localizada de tecidos duros orais, quando suscetíveis a subprodutos ácidos da fermentação bacteriana dos

carboidratos presentes na alimentação (5,6) Esta destruição é de origem multifatorial e inicia-se como consequência de uma disbiose do biofilme estabelecido e é afetada pelo fluxo e composição salivar, exposição ao flúor, consumo de açúcares e por comportamentos preventivos (7–9).

As bactérias que estão presentes na cavidade oral formam micro-colônias que são encapsuladas numa matriz orgânica de polissacarídeos, proteínas e DNA secretados pelas células, fornecendo proteção contra a dessecação, defesas do hospedeiro e predadores e proporcionam maior resistência a agentes antimicrobianos (5,9).

Uma colonização microbiana de um grande número de bactérias e dos seus subprodutos, acumula-se num biofilme, nas superfícies dos dentes em estados de saúde e doença (6,9).

A saliva contém uma variedade de proteínas que participam na manutenção da integridade do dente e na prevenção da cárie através de diversos mecanismos, como a capacidade de formação de uma película de esmalte adquirida para proteção contínua contra o desgaste dentário (mucinas e glicoproteína rica em prolina), inibição da desmineralização de superfícies dentárias (mucinas), promoção da remineralização do esmalte pela atração de iões cálcio (proteínas ricas em prolina e estatina), atividades antimicrobianas, incluindo a prevenção da aderência de espécies cariogénicas à superfície do esmalte (histatinas e cistatinas), agregação de microrganismos (aglutinina e imunoglobulinas) e a secreção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (10,11).

Atualmente, as funções biológicas das proteínas salivares têm sido extensivamente estudadas devido à sua possível relevância para a avaliação do risco de cárie. Por exemplo, baixos níveis de estatina e cistatinas podem estar relacionadas à suscetibilidade de cárie (12). A evolução do conhecimento referente à função destas proteínas salivares, bem como das suas modificações pós-traducionais poderão fornecer um repertório promissor de biomarcadores específicos para o diagnóstico de cárie (13). A descoberta destes biomarcadores salivares e a sua consequente expansão de conjunto de dados, ajudarão a estabelecer um modelo de diagnóstico precoce de cárie dentária (14).

1.2 Doença periodontal

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que afeta mais de 50% dos adultos em todo o mundo e a sua prevalência aumenta com o avanço da idade (15).

A doença periodontal consiste numa infecção crônica, multifatorial associada a microrganismos anaeróbios. É caracterizada por processos inflamatórios desencadeados por predominantemente bactérias Gram-negativas na placa dentária e representa o fator causador predominante da perda dentária não traumática em adultos (16).

As principais bactérias associadas há doença periodontal são *Actinobacillus actinomicetemcomitans*, *Phorphiromonas gingivalis*, *Tanerella forsythensis* e *Prevotella sp.* (17,18).

O periodonto inclui os tecidos que suportam a peça dentária, incluindo osso alveolar, cemento, ligamentos periodontais e tecido conjuntivo (19–22). Este, pode ser danificado através de uma inflamação infecciosa traduzindo-se num processo patológico resultante da interação das bactérias com os mecanismos de defesa do hospedeiro, causando uma inflamação periodontal crônica, ou uma gengivite. A gengivite pode evoluir para um estado de doença periodontal, caso os agentes bacterianos patogénicos permaneçam no periodonto sem tratamento (23,24).

A gengiva marginal livre saudável mede 1,5mm em redor de todos os dentes (25) no entanto a infecção periodontal provoca um sulco gengival mais profundo, patológico, resultando uma migração apical do epitélio juncional, destruição do ligamento periodontal, do cemento e do osso alveolar (26).

Clinicamente, a periodontite caracteriza-se pela perda de inserção, acompanhada pela formação de bolsas e alterações na densidade e altura do osso alveolar subjacente (27). Os microrganismos presentes na placa bacteriana produzem endotoxinas e lipopolissacarídeos que induzem a produção de

citocinas (troboxano A2, interleucina 1 β , interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α), além de proteínas C-reativas, iniciando-se assim um processo inflamatório (26), demonstrado na Figura 1.

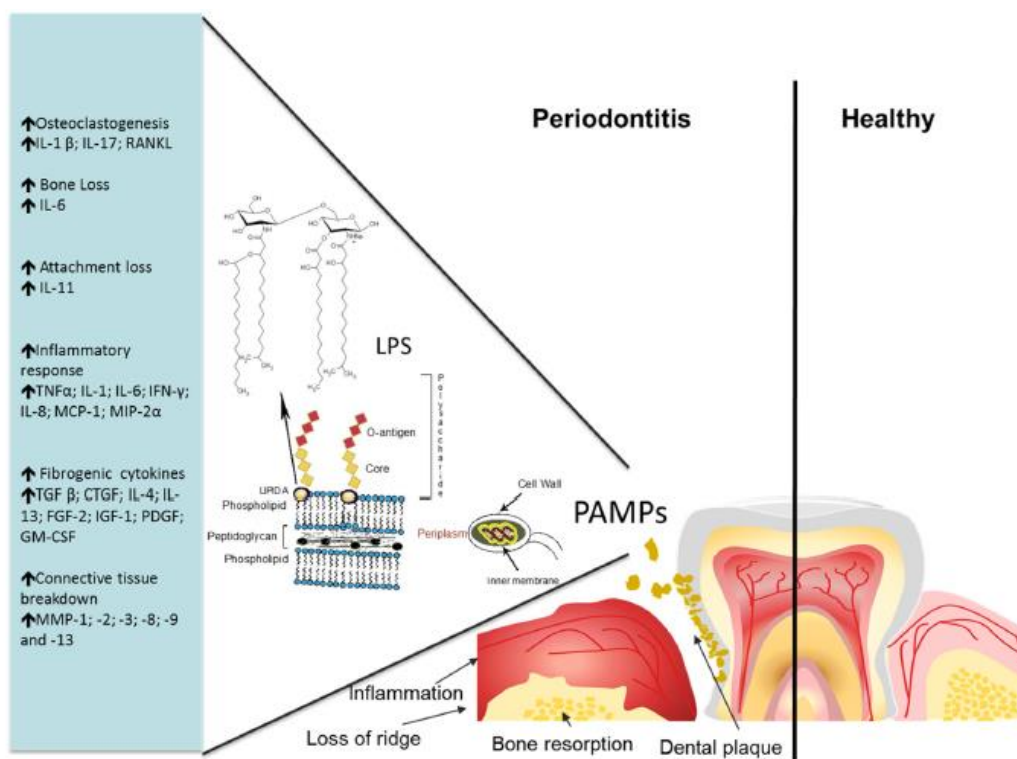


Figura 1- Imagem adaptada de (28): Representação esquemática de moléculas associadas à doença periodontal.

A periodontite é uma inflamação crônica caracterizada pela destruição do periodonto, levando a perda de estruturas de suporte e conseqüentemente, a perda dentária (28).

Tanto a gengivite quanto a periodontite são moduladas pela resposta imune do hospedeiro e por fatores ambientais tais como tabagismo, obesidade, diabetes e stress (26). Estando a periodontite fortemente associada ao desenvolvimento de doenças sistêmicas, como diabetes e endocardite infecciosa, como iremos falar no tópico seguinte (24).

1.3 Saúde oral vs. saúde sistêmica

Nos últimos anos, tem havido uma crescente percepção da saúde oral como parte integrante da saúde sistêmica. Além disso, existe uma associação entre as doenças orais e as principais DNT (doenças não transmissíveis), uma vez que ambas partilham fatores de risco comuns, existindo indicadores que

apontam para o facto da própria doença oral representar um fator de risco para as DNT (2).

Ao todo, foram identificadas mais de 100 doenças relacionadas entre as doenças sistémicas e as manifestações orais, tais como diabetes, doenças cardiovasculares, infeções respiratórias, cancro ou problemas nutricionais (2).

Durante as últimas décadas, vários estudos epidemiológicos avaliaram a associação entre saúde oral e saúde sistémica. Trata-se de uma relação multifatorial e complexa, na qual as doenças sistémicas influenciam, direta ou indiretamente, a saúde oral e as alterações na saúde oral, possuem por sua vez impacto na saúde sistémica (29).

A periodontite é a patologia oral mais frequentemente relacionada com doenças sistémicas não transmissíveis. Quando não tratada, origina uma disbiose, em que o biofilme, originalmente fisiológico, se torna patológico, podendo entrar no corpo através da área inflamada ou sendo inalado e/ou ingerido, aumentando assim o risco de pneumonia e gastrite (29).

A saúde oral deixa assim de ser vista como um problema localizado apenas na cavidade oral, para ser relacionada sistemicamente, o que lhe confere automaticamente mais relevância.

O aumento da consciencialização da importância da saúde oral deve ser acompanhado pelo desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e monitorização da doença oral. Estas ferramentas, que devem ser não invasivas, de baixo custo e de rápida utilização, poderão ter um papel importante na ajuda à decisão clínica e na tomada de decisão para o encaminhamento de doentes, para o sistema de saúde geral (2). Urge, pois, desenvolver uma ação concertada de modo a assegurar que as prioridades de investigação em saúde oral recebem a atenção e os recursos necessários para que os resultados da investigação sejam rápidos, amplamente divulgados e implementados. O atual atraso significativo na implementação dos resultados de investigação e das inovações tecnológicas na prevenção e na prática clínica, está a dificultar a obtenção de melhores índices de saúde oral a nível global e a redução das desigualdades neste campo (2).

É imperativo o desenvolvimento e aperfeiçoamento da investigação para melhoria da saúde oral. Uma das estratégias a utilizar poderá passar pela

utilização da saliva como fluido de diagnóstico, oferecendo diversas vantagens quando comparado com outros fluidos biológicos uma vez que a sua recolha é fácil, rápida, barata e não invasiva (30,31).

2. Saliva como meio de diagnóstico

A saliva é um fluido biológico composto por secreções das glândulas salivares *major* (parótida, submandibular, sublingual) e *minor* com um vasto conjunto de hormonas, proteínas, enzimas, anticorpos e citocinas(30).

Em termos de constituição apresenta 99% de água, 0,3% de proteínas e 0,2% de substâncias orgânicas e inorgânicas (30).

Este fluido possui um papel importantíssimo em muitas das funções biológicas, como a deglutição, a mastigação, o paladar, bem como, na proteção da mucosa oral contra infeções bacterianas, virais e fúngicas, mantendo, assim, o ecossistema da cavidade oral em equilíbrio (30).

O diagnóstico salivar integra um instrumento para a deteção precoce, prevenção e terapia individualizada quer de patologias orais, quer de patologias sistémicas, uma vez que incorpora moléculas que refletem os estados fisiológicos e patológicos do individuo.

A cavidade oral é um meio muito complexo, que para além de ser o “espelho da saúde do corpo”(32), é aqui que ocorrem interações entre os tecidos biológicos e os microrganismos, ar e alimentos. A saliva pode contribuir para a defesa do hospedeiro, através da defesa contra o stress oxidativo, uma vez que a sua composição permite a modulação de danos oxidativos na cavidade oral (32,33).

Como fluido de diagnóstico, apresenta um grande potencial oferecendo diversas vantagens quando comparado com outros fluidos biológicos uma vez que a sua recolha é fácil, rápida, barata e não invasiva (30,31). Como não há necessidade de usar agulhas para colheita de amostras, é mais confortável para os pacientes, reduzindo os níveis de ansiedade muitas vezes associados(30).

Nos últimos anos, vários trabalhos de investigação levaram ao desenvolvimento de novas tecnologias e identificaram uma ampla gama de potenciais biomarcadores salivares visando o uso da saliva no contexto clínico.

Tendo em conta estas características a saliva é atualmente utilizada para diagnóstico precoce e monitorização de patologias orais ou sistémicas (34,35). Vários estudos demonstram que a presença de biomarcadores de várias doenças na saliva são úteis para o diagnóstico de algumas condições prevalentes como osteoporose, neoplasias malignas, doenças infecciosas (por exemplo, cárie dentária, doença periodontal e HIV) e doenças cardiovasculares (36). No entanto, há uma necessidade urgente de decifrar o racional científico e os mecanismos moleculares que expliquem a existência de um reflexo das doenças sistémicas na saliva (30) que permita o desenvolvimento de dispositivos “*point-of-care*” que possam servir como uma ferramenta de diagnóstico e monitorização não invasiva.

Além disso, a maioria das estratégias atualmente seguidas visam a identificação de biomarcadores individuais que carecem muitas vezes de especificidade e não mostram, *per si*, o real contexto molecular característico de uma dada condição fisiológica ou patológica. Urge, pois, desenvolver estratégias que em vez de identificar biomarcadores individuais, tenham uma abordagem mais ampla, levando à identificação de perfis totais de proteínas característicos de determinados fenótipos.

Para isso é importante como primeira estância, sendo conhecido que alguns fatores como idade, sexo, biorritmo (37–39), contribuem para alterar a expressão de proteínas na saliva, definir o perfil de proteínas correspondentes ao “indivíduo saudável”, bem como ter em conta também as variações inter-individuais, para de uma forma fidedigna compara-los com episódios de não saúde.

A associação dos perfis de proteínas presentes na saliva, SalivaPrint, à identificação das proteínas responsáveis pela alteração de perfis em diferentes situações de saúde e de doença, permitirá construir um referencial poderoso para a criação de estratégias de diagnóstico não invasivas.

2.1. Técnicas para determinação de proteínas na saliva

Sendo a saliva um fluido cada vez mais utilizado em diagnóstico (40), várias técnicas foram usadas para adquirir informação molecular deste fluido sendo as principais a genómica, proteómica e transcriptómica, designadas no seu conjunto como “Ómicas”. Os resultados das Ómicas revelaram informações sobre algumas moléculas que são desreguladas em certas situações de saúde e doença. Essa informação encontra-se muitas vezes dispersa pela bibliografia mas dada a sua importância para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico, algumas iniciativas visaram a criação de algumas bases de dados (41–45), permitindo a sua consulta e utilização pela comunidade científica.

Uma dessas bases de dados é a SalivaTecDB (43,46), desenvolvida pelo grupo de investigação do SalivaTec e que apresenta dados de proteómica (humanos e microbianos), de transcriptómica (miRNAs) e do microbiota oral (associado a diversas patologias orais e sistémicas).

As principais técnicas utilizadas atualmente para identificação e quantificação de proteínas utilizáveis para diagnóstico são designadas técnicas de proteómica (espetrometria de massa e eletroforese 2D). Estas técnicas podem ter uma abordagem: *Bottom-up* ou *top-down*. Na *Bottom-up* recorre-se normalmente à cromatografia líquida para separar os péptidos formados após lise proteolítica (utilizando normalmente tripsina) de uma solução complexa e, posteriormente, realiza-se a espectrometria de massa (MS) para análise dos mesmos. É uma metodologia vantajosa no que se refere a sensibilidade e reprodutibilidade, contudo alguns péptidos perdem-se durante a cromatografia e noutros não é possível reconhecer as alterações pós-transducionais (47).

No caso da metodologia *top-down* recorre-se à MS para análise das proteínas sem serem sujeitas a degradação proteolítica, sendo esta uma vantagem em relação à metodologia anterior, na medida em que não são analisados os fragmentos mas sim as proteínas inteiras o que permite uma identificação mais simples e mais isenta de erros dos constituintes da amostra (47).

Outra metodologia utilizada para a separação de proteínas é através de eletroforese uni (1-DE) e bidimensional (2-DE). A eletroforese bidimensional envolve a separação de proteínas em duas etapas seguidas. Na primeira, a focagem isoelétrica, há migração das moléculas em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado ou gerado por tampões anfotéricos até atingirem um ponto no qual a sua carga é igual a zero. Na segunda, as proteínas são separadas de acordo com a sua massa molecular através uma eletroforese com direção perpendicular à primeira, em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Esta segunda etapa é idêntica à eletroforese 1-D em que as proteínas são separadas de acordo com a massa molecular através de uma corrida em gel SDS-PAGE (48).

Esta metodologia, utilizando a eletroforese, permite obter muitas informações importantes, contudo ainda apresenta algumas limitações, tais como: a utilização de alguns fluidos corporais com proteínas em concentrações abundantes dificulta a migração destas por eletroforese, por outro lado para as proteínas serem analisadas por *top-down* é necessário que estas estejam intactas o que é difícil uma vez que têm de ser extraídas do gel (47).

A MS utiliza um aparelho denominado espectrômetro e permite a identificação e quantificação de proteínas. Esta metodologia é muito utilizada em proteômica e permite avaliar essencialmente o rácio massa/carga (m/z) de iões em fase gasosa (49).

Alguns estudos das proteínas e de outros componentes salivares, já permitiram identificar variações entre os estados de saúde normais e de doença. Contudo, só após uma completa caracterização do proteoma salivar humano saudável, será possível a sua comparação com o proteoma de indivíduos com determinada patologia, podendo assim diagnosticá-la ou monitorizá-la (40). Desta modo, não é surpreendente que diferentes biomarcadores tenham sido propostos para a mesma patologia (37), devido a falta de especificidade quando avaliados isoladamente. Torna-se assim, necessário melhorar a metodologia aplicada, através da avaliação da saliva como um todo, onde são caracterizados perfis proteicos e não biomarcadores específicos onde a sua presença ou ausência não implica um estado de saúde ou doença.

Apesar das técnicas de espectrometria de massa e da eletroforese 2-D desempenharem um papel importantíssimo na identificação de proteínas em

saliva de indivíduos em diferentes condições, apresentam algumas lacunas quando se trata de refletir o estado geral do indivíduo que impossibilita a sua utilização generalizada sobretudo em populações de grandes dimensões. O seu custo e complexidade de análise também se incluem nas contrapartidas.

2.1.1 Diagnóstico molecular – O SalivaPrint

Como referido anteriormente, é importante termos estratégias que em vez de identificar moléculas sejam capazes de mostrar variações totais nos perfis dessas moléculas. Uma das técnicas que pode ser utilizada para obter um perfil total de proteínas da saliva em vez identificar algumas proteínas específicas é a electroforese capilar. A eletroforese capilar é uma das técnicas de eletroforese mais sensíveis, capaz de ser utilizada para caracterizar o principal conteúdo proteico da saliva. No entanto, devido às ferramentas atualmente disponíveis para análise de resultados exigirem inspeção manual e visual dos perfis, continua a ser extremamente difícil analisar um grande número de perfis, para grandes estudos populacionais (50). Alguns esforços têm sido feitos no sentido de analisar de forma mais automática e padronizada os perfis obtidos com esta técnica, retirando todo o potencial de comparação de perfis em diferentes condições fisiológicas. Um desses trabalhos levou ao desenvolvimento do SalivaPrintToolKit (50). Esta estratégia utiliza um sistema de electroforese capilar baseado na utilização de chips, extremamente padronizado, o sistema automatizado Experion™ (da Bio-Rad Laboratories, EUA). Este sistema integra a análise de proteínas num único processo em que a separação de proteínas, a coloração, a deteção de bandas e quantificação são executadas automaticamente e produzem perfis de proteínas em cerca de 30 min (10 amostras) através de um processo automatizado. Ao realizar a eletroforese capilar, é possível obter um perfil proteico da amostra dentro dos pesos moleculares (MW) na faixa de 10 a 260kiloDaltons (kDa) enquanto separa e deteta concentrações de proteína na faixa de 2,5 a 2000 ng / mL (50).

O software do sistema é responsável pelo tratamento dos dados do índice de fluorescência em função do tempo de migração para produzir um eletroferograma. A partir dos dados do eletroferograma é gerada uma imagem

do gel virtual (50). As bandas ou picos de proteínas são identificados através do tempo de migração utilizando marcadores conhecidos de MW (50).

Depois da obtenção dos dados brutos, o SalivaPrintToolkit utiliza um script que permite transformar os dados de forma a poderem ser comparados os perfis obtidos tendo em conta fatores como o MW, altura do pico, concentração de proteínas e concentração total de proteínas nas amostras, entre outros. Esta informação pode ser usada posteriormente para caracterizar cada indivíduo e / ou a população a que pertence (50).

As diferenças nestes perfis também são úteis para a identificação de faixas de peso molecular em que há proteínas desreguladas associadas a patologias ou fenótipos específicos e, portanto, têm potencial para serem usados para efeitos de diagnóstico (50). Está em curso o desenvolvimento de uma estratégia que utiliza os dados armazenados na base de dados SalivaTecDB (<http://salivatec.viseu.ucp.pt/salivatec-db>) e a ferramenta Expsy Compute pl / MW tool (51) para identificar quais as proteínas que podem ter determinados pesos moleculares quando separadas em electroforese. No entanto esta estratégia não está ainda disponível para utilização.

A utilização da eletroforese capilar capaz de separar as proteínas presentes num determinado fluido, como a saliva, permitindo criar um perfil que retrate os acontecimentos moleculares que estão a ocorrer em determinada situação denomina-se um SalivaPrint (50) que é uma técnica mais simples e barata e que apesar de não permitir identificar imediatamente as proteínas pode mostrar um perfil que pode refletir as alterações globais de proteínas que acontecem em diferentes situações fisiológicas ou patológicas.

O SalivaPrint é, pois útil para comparar automaticamente um grande número de amostras, facilitando o processo de comparação de semelhanças e diferenças entre elas (52). Para que se possa retirar todo o potencial desta estratégia é imperativo determinar como variam estes perfis de proteínas na saliva de indivíduos com diferentes características (por exemplo, com diferentes idades e género) e com diferentes condições de saúde oral.

2.2. Variação da composição da saliva com a idade e gênero

Nos últimos tempos, as análises ao proteoma salivar têm ganho cada vez mais importância. No entanto, como a variabilidade do proteoma salivar depende de inúmeros fatores como idade, sexo, IMC, tabagismo e até tipo de educação é importante existirem várias abordagens a conjuntos de amostra suficientemente grandes para se compreender de que forma se manifestam estes fatores de variabilidade (38).

Pouco se sabe sobre as alterações associadas a idade e sexo na saliva humana que, possivelmente, podem fornecer indicadores para melhor diagnóstico e tratamento de muitas doenças (53). Existem estudos como o de Murr *et al.* em que se encontrou uma associação consideravelmente maior relativamente à idade, em comparação com o sexo em amostras de saliva (38).

No entanto, sabe-se que a catepsina B por exemplo, é mais abundante na saliva do sexo feminino (54) enquanto a calpastatina e a serpina B3 têm maior abundância na saliva de indivíduos do sexo masculino e funcionam como inibidores de proteases (55,56).

Fleissig *et al.* comparou um pequeno grupo de indivíduos do sexo feminino e masculino usando 2D-SDS-PAGE identificaram seis proteínas com expressão significativamente maior no sexo feminino incluindo β -2-microglobulina e transferrina. Relativamente a alterações com a idade, revelaram diminuição na expressão de oito proteínas com o envelhecimento entre indivíduos do sexo masculino e sete proteínas diferencialmente expressas com o envelhecimento entre indivíduos do sexo feminino, incluindo proteína indutível por prolactina, cadeia leve de Ig-k, transferrina e calgranulina (57).

Sun *et al.* escolheu uma abordagem 2D-LC-MS / MS e concentrou-se em glicoproteínas, a glicosilação é uma modificação pós-traducional comum que desempenha um papel importante em muitos processos celulares, por exemplo, conformação de proteína, dobramento, transporte, direcionamento e estabilidade (58). No total, eles identificaram sete proteínas diferentes entre os gêneros (59).

Por outro lado, Wang *et al.* não encontrou uma relação direta específica para o género, mas constatou correlação significativa com a idade (60).

Tal como, foi recentemente demonstrado que em amostras de indivíduos adultos, existe uma alteração dependente da idade e do género no gene de expressão da glândula parótida. Contudo Cabras *et al.*, neste seu estudo, não observou diferenças em nenhum dos seus cinco grupos etários; no entanto, o tamanho da amostra era pequena (61).

Existe ainda muita controvérsia sobre a real variabilidade existente na composição salivar entre géneros e idades diferentes, sabendo-se que diversos fatores poderão influenciar estas alterações, como o tabaco (62), interessa assim isola-los ao máximo para que possamos compreender resultados mais fidedignos e com menores variações.

Portanto, o primeiro passo para o desenvolvimento de testes diagnósticos em saliva, requer a padronização dos perfis de proteínas de indivíduos saudáveis e a sua variação com diferentes fatores como a idade, o género e a saúde oral.

3. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos principais:

1. Verificar se há variação do SalivaPrint com a idade e com o género
2. Verificar se o perfil de proteínas da saliva por eletroforese capilar (SalivaPrint) se relaciona com a saúde oral.
3. Verificar se há relação dos parâmetros físico-químicos da saliva com os índices de saúde oral (CPOD e PSR)

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e métodos

De modo a atingir os objetivos propostos foram concretizadas as seguintes metodologias

1. Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Católica Portuguesa (UCP). Adicionalmente, foi pedido aos dadores, antes de qualquer colheita, o preenchimento do consentimento da recolha de amostras ANEXO (I).

2. Caracterização do tipo de estudo

O presente estudo caracteriza-se como um estudo observacional transversal sendo que a observação, é do tipo participante tendo em conta o papel do observador junto à população (63) e é realizado em conjunto com o SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva), do Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde (CIIS) da Universidade Católica Portuguesa (UCP), Centro Regional de Viseu.

3. Caracterização da população e da amostra

Para a realização deste estudo foram recolhidos dados e amostras de indivíduos do sexo feminino e masculino, dos 25 aos 50 anos sistemicamente saudáveis. Foram também utilizadas amostras presentes na coleção de amostras do SalivaTec com faixas etárias inferiores a 13 anos e compreendidas entre os 13 e os 24 anos. Estas amostras irão ser utilizadas para comparação da idade e género. Existem assim, os seguintes grupos de estudo representados na Tabela1 abaixo.

Tabela 1- Caracterização dos grupos de estudo

Grupo	Características
G1	<13 anos saudáveis sistémicos e orais; femininos e masculinos
G1F	<13 anos saudáveis sistémicos e orais; femininos
G1M	<13 anos saudáveis sistémicos e orais; masculinos
G2	13-24 anos saudáveis sistémicos e orais; femininos e masculinos
G2F	13-24 anos saudáveis sistémicos e orais; femininos
G2M	13-24 anos saudáveis sistémicos e orais; masculinos
G3	25-50 anos saudáveis sistémicos e orais; femininos e masculinos
G3F	25-50 anos saudáveis sistémicos e orais; femininos
G3M	25-50 anos saudáveis sistémicos e orais; masculinos
G4	Todos os indivíduos do género feminino saudáveis sistemicamente e oralmente
G5	Todos os indivíduos do género masculino saudáveis sistemicamente e oralmente
G6	25-50 anos saudáveis sistémicos com patologia oral; femininos e masculinos

3.1 Dimensão da amostra

A amostra é constituída por um total de 79 participantes, como podemos observar na Tabela2. É importante referir que estas amostras foram guardadas a -80°C na coleção de amostras do SalivaTec até à sua utilização.

Tabela 2- Caracterização da dimensão da amostra

SAUDÁVEIS SISTÉMICOS E SAUDÁVEIS ORAIS

FAIXA ETÁRIA	<13	13-24	>25<50
MULHER	14	15	11
HOMEM	5	11	6
TOTAL	19	26	17

SAUDÁVEIS SISTÉMICOS COM PATOLOGIA ORAL			
MULHER	_____	_____	11
HOMEM	_____	_____	6
TOTAL			17

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios para exclusão do grupo de dadores saudáveis sistémicos foram definidos de acordo com a literatura (38,60), ou seja, que não tomem medicação diariamente, que não tenham feito uso da toma de antibiótico nos últimos 3 meses (62), não tenham feito qualquer tratamento de quimioterapia ou radioterapia, não seja fumador e com hábitos de consumo de álcool moderados e com uma faixa etária compreendida entre os 25 e os 50 anos.

A seleção dos indivíduos a participar neste estudo foi feita através da aplicação de distintos critérios de inclusão e exclusão, dependendo de em que grupo se iriam incluir, no entanto todos têm de ser saudáveis sistémicos.

Assim, para os grupos G1, G2, G3, G4 e G5 descritos acima, que se caracterizam como saudáveis sistêmicos e orais (64), temos os critérios de inclusão e exclusão representados na Figura 2.

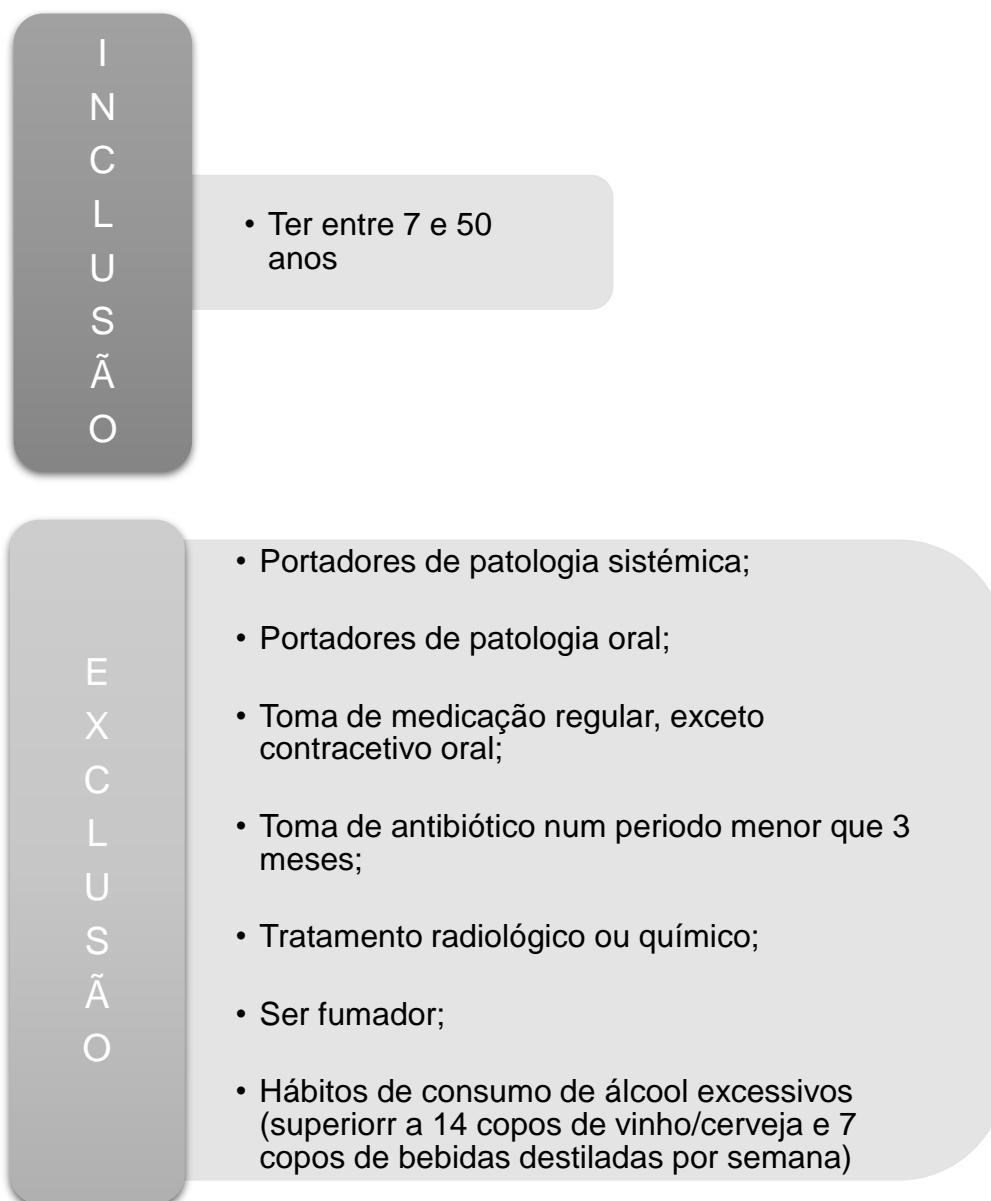


Figura 2- Critérios de inclusão e exclusão G1, G2, G3, G4 e G5

Para o presente estudo temos ainda o grupo G6, que difere dos grupos anteriores por possuir patologia oral (cárie, gengivite ou periodontite) e estar compreendido no grupo de idades do 25 aos 50 anos. Os critérios de inclusão e exclusão estão descritos na Figura 3 de forma sistemática.

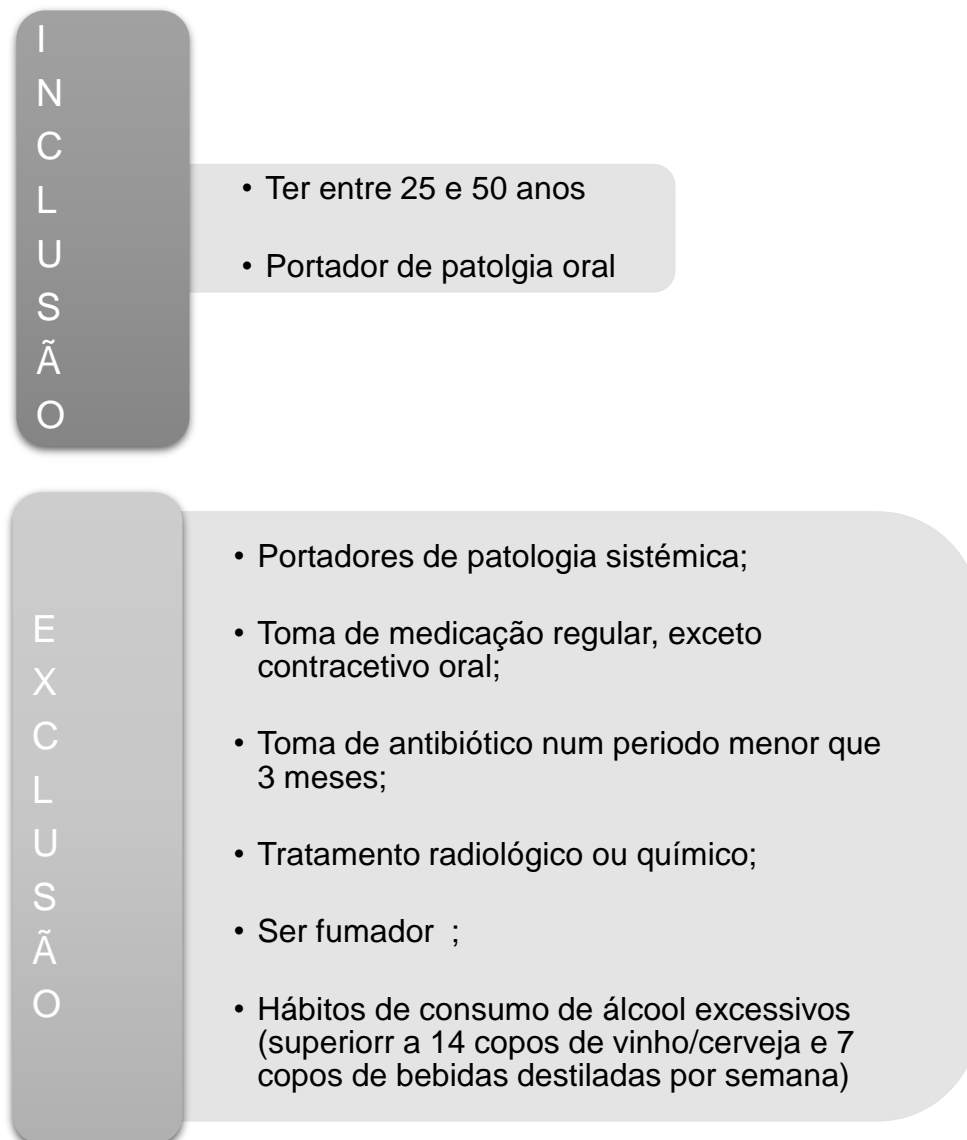


Figura 3- Critérios de inclusão e exclusão G6

4. Recolha de dados clínicos

A sequência da colheita de dados foi a seguinte: 1º Entrega e preenchimento do consentimento informado (Anexo I) e 2º Entrega e preenchimento do questionário do dador e operador (Anexo II e III).

O consentimento livre e informado, foi assinado pelos participantes no estudo, sendo fornecidas informações acerca dos objetivos, procedimentos, benefícios e riscos da colheita bem como acerca da identificação, confidencialidade e conservação das amostras (Anexo I). Informou-se, ainda, que os dados fornecidos pelos participantes seriam mantidos em sigilo,

recebendo os mesmos, caso o pretendessem, indicadores acerca dos tratamentos necessários a realizar, sob o ponto de vista dos investigadores participantes.

O questionário entregue tem como objetivo a caracterização dos pacientes a nível clínico (incluindo a saúde oral). Este questionário inclui a caracterização geral da amostra e acerca do dador, questões acerca dos hábitos tabágicos e alcoólicos. Em seguida foram aplicadas questões relativas a condição sistémica dos participantes como a toma regular de medicação e patologias. E ainda foram aplicadas questões relativas aos hábitos e comportamentos de higiene oral (65). O questionário a preencher pelo Médico Dentista consistia na caracterização dos elementos dentários, por intermédio do Índice CPOD, caracterização da saúde periodontal através da utilização do índice PSR e o diagnóstico periodontal.

4.1 Avaliação da saúde oral

Todos os pacientes foram avaliados clinicamente por um examinador calibrado. A avaliação da saúde oral foi feita por inspeção intraoral caracterizando-se os elementos dentários, por intermédio do Índice CPOD, caracterização da saúde periodontal através da utilização do índice PSR e o diagnóstico periodontal.

Para o índice de cárie foi utilizado o índice de CPOD (Tabela 3). Trata-se de um índice amplamente utilizado em estudos epidemiológicos, consistindo na soma do número de dentes cariados, perdidos e obturados de cada indivíduo, podendo depois ser calculada a média da população em estudo. Para preenchimento do Índice CPOD, foram seguidos os critérios para a determinação dos dentes cariados, perdidos e obturados, sugeridos pela OMS (66). E avaliado o estado da saúde oral segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (15).

Tabela 3- Critérios utilizados para determinação do Índice CPOD

Código	Critério
0	Hígido
1	Lesão de cárie
2	Restaurado com cárie
3	Restaurado sem cárie
4	Dente perdido por cárie
5	Dente perdido por outra razão
6	Selante de Fissuras
7	Prótese ou Implante
8	Incluso
T	Trauma
9	Não Registrado

Para a doença periodontal utilizamos o PSR, um método rápido e objetivo capaz de quantificar a doença periodontal baseado em três indicadores: sangramento gengival a sondagem, presença de cálculo dentário e profundidade de sondagem (67). Além disso, avalia também a presença de envolvimento de furca, mobilidade dentária, problemas mucogengivais e recessões gengivais superiores a 3,5 mm. Quando pelo menos uma das condições acima estiver presente, um asterisco (*) deve ser acrescentado à pontuação PSR para o sextante em questão (67). Preenchendo-se o PSR (Periodontal Screening and Recording Index) de acordo com a escala fornecida pela OMS, Tabela 4.

A informação é recolhida em função dos seis sextantes. O primeiro sextante inclui os dentes 18 a 14 de acordo com a classificação da OMS, o segundo, os dentes 13 a 23 e assim sucessivamente. Foi sondado 1 dente em cada sextante, o que se encontrava periodontalmente em “pior estado”, cada dente é sondado em seis locais diferentes.

Para detetar condições patológicas sem produzir dor ou resultados falsos, recomenda-se uma força máxima de sondagem de 20g (67).

Assim, cada dente é classificado de 0 a 4, mas apenas a maior pontuação do sextante é registada. Além disso, os sextantes com menos de dois dentes são classificados com um 'X' e não são considerados na avaliação geral (67).

Durante o exame clínico oral foi utilizada uma sonda periodontal milimétrica - *ClickProbe®* - sendo, com ela, avaliados dois parâmetros indicadores do status de saúde oral: a profundidade de sulco e o índice de sangramento.

Tabela 4- Tabela representativa dos critérios utilizados para preenchimento do PSR

NÍVEL	CRITÉRIO
0	Saúde Periodontal
1	Sangramento à sondagem
2	Presença de cálculo supragengival
3	Bolsa periodontal de 3,5-5,5 mm
4	Bolsa periodontal > 6mm
*	Recessão, mobilidade dentária, envolvimento de furca ou problemas mucogengivais

4.1.1 Calibração

Para assegurar que os resultados possam ser comparáveis e de forma a que em trabalhos futuros também estas amostras possam ser utilizadas para o desenvolvimento de outros projetos foi necessário proceder-se a uma calibração de examinadores.

Foram recrutados 10 pacientes, todos alunos da Clínica Universitária da UCP.

O protocolo de examinação consistiu em duas fases. Primeiramente, os sete examinadores, mediram o CPOD de cada paciente e comparados os diferentes resultados, comprovando que em média, todos obtiveram os mesmos resultados, estando assim apenas estes examinadores autorizados a fazer recolhas válidas. Posteriormente, após clarificada a nova classificação do estado de saúde e doença periodontal por cada um dos examinadores, estes foram

realizar as profundidades de sondagem e de recessão gengival em 6 superfícies por dente (disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual), em todos os dentes, de todos os pacientes.

5. Recolha de amostras de saliva

Para definir o perfil de proteínas da saliva de indivíduos saudáveis foram recolhidas amostras de saliva total não estimulada, sendo que o seu processamento e armazenamento foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido no *SalivaTec* (33) (Anexo IV). A saliva foi recolhida entre as 9 horas e as 11 horas para minimizar os efeitos do ritmo circadiano.

Podem ser utilizados para a obtenção de amostras de saliva diferentes procedimentos, sendo que para este estudo, foi recolhida saliva total não estimulada recorrendo à colocação de dois rolos de algodão em posição sublingual (Anexo IV). Uma vez que o volume salivar e a composição da saliva são influenciados pelo horário da recolha, estação do ano, posição do paciente, estado de hidratação, idade, uso de medicamentos e muitos outros fatores (32) o procedimento de recolha tem de ser feito sempre nas mesmas condições para estes parâmetros. Nesse sentido, solicita-se aos dadores para se absterem de comer, beber ou fazer procedimentos de higiene oral uma hora antes da recolha de saliva. Antes da colheita, todos os participantes devem fazer um bochecho durante 30 segundos com 10mL de água engarrafada fornecida através de um tubo de falcon de 50mL, para remover restos alimentares, células epiteliais descamadas e microrganismos e de seguida deve ser cuspidada de novo para o tubo. Este é fechado e armazenado. Após esta fase, é aguardado um minuto até se proceder à recolha de saliva. São colocados dois rolos de algodão esterilizado na zona sublingual até perfazer dois minutos, os quais são removidos e colocados no interior de um tubo de falcon de 15 mL.

Seguidamente, como o tempo de armazenamento e o congelamento, pode alterar alguns parâmetros da saliva (68), procedeu-se à centrifugação das amostras a 10.000 xg, durante 10 minutos, a 4°C, recolheu-se o sobrenadante e procedeu-se à avaliação dos seguintes parâmetros salivares: i) concentração de

proteína, através do Pierce™ BCA Protein Assay Kit, seguiram-se os passos estipulados no protocolo do fabricante (Anexo V); ii) fluxo salivar, calculado dividindo a quantidade total de saliva obtida por minuto; iii) pH, utilizando um microeléctrodo Hanna HI1083B (33).

Posteriormente, todas as amostras foram aliqüotadas para armazenamento numa arca congeladora a -80°C, destinadas a posterior avaliação.

Foi atribuído a cada amostra, à medida que iam sendo colhidas, um código para facilitar a gestão das amostras

6. Determinação e análise do perfil de proteínas da saliva (Saliva Print)

O perfil total de proteínas da saliva (SalivaPrint) foi obtido por eletroforese capilar, usando o sistema *Experion™ Automated Electrophoresis System* (Biorad) em chips standard de proteínas (Experion™ Pro260 Analysis Kit) de acordo com as especificações técnicas fornecidas pelo fabricante (33) seguindo o protocolo (Anexo VI). O perfil de proteínas e a quantificação das bandas foram obtidos com recurso ao Experion™ Software, version 3.20 (Figura 4).



Figura 4- Imagem ilustrativa do equipamento *Experion™ Automated Electrophoresis System* (Biorad) adaptada de (69)

O Experion permite obter os perfis proteicos de dez amostras, em simultâneo, através de um único processo que realiza a separação, coloração, deteção e quantificação das proteínas presentes nas amostras de saliva, tudo através de um processo automatizado que demora trinta minutos a ser executado(50).

Resumidamente, começou-se por fazer a normalização da concentração de proteína total de cada amostra colocada em cada poço a 2000 µg, assegurando que estão dentro dos limites de leitura do Experion e a padronização da concentração total de proteínas entre as amostras analisadas, otimizando a comparação dos diferentes perfis. De seguida, faz-se a preparação do Gel (G) e do Gel-Stain (GS), e prepara-se o Buffer das amostras nas condições redutoras, que é adicionado às amostras e ao Ladder. Estes são aquecidos em banho maria a seco durante 10min. Adiciona-se água desionizada e estão preparados para serem pipetados no chip. Antes de se iniciar a pipetagem das amostras, do Ladder e dos dois tipos de géis no chip, é necessário preparar o chip (69). Após o chip preparado inicia-se o carregamento, nos respetivos poços assinalados no chip (69).

Cada chip permite obter os perfis proteicos de 10 amostras, em simultâneo, no entanto neste estudo foram utilizadas réplicas de todas amostras, por isso cada chip continha 5 amostras.

O marcador de pesos moleculares incluído no kit Pro260 é utilizado como padrão. A curva de calibração utilizada em todas as análises é feita usando um padrão interno fornecido pelo fabricante. Este método tem uma resolução de 2,5 - 2000 ng/ mL de proteína e consegue separar proteínas de 10 - 260 kDa. O perfil de proteínas e a quantificação das bandas são obtidos com recurso ao Experion™ Software, version 3.20 (33). Os perfis resultantes desta estratégia são representados pelas massas moleculares no eixo dos XX e pela fluorescência, correspondente à concentração de uma ou um conjunto de proteínas, no eixo dos YY, como se pode observar a título de exemplo na Figura 5.

Quando existe presença de proteínas num determinado intervalo de pesos moleculares, será, através da deteção da fluorescência, possível visualizar picos

no perfil obtido que vão variar em morfologia de acordo com a concentração total de proteínas, detetada pela intensidade da fluorescência.

A análise dos perfis obtidos foi feita recorrendo à ferramenta SalivaPrint Toolkit. O SalivaPrint Toolkit serve como uma ferramenta de caracterização fenotípica de pacientes para identificar pesos moleculares relacionados com condições particulares e, a partir daí, encontrar proteínas, que podem estar envolvidas nos mecanismos celulares desregulados (33).

O algoritmo SalivaPrint Toolkit permite a criação de perfis médios e a identificação dos intervalos de massas moleculares em que estão presentes 7 picos principais. Existem evidências científicas onde os intervalos variam de acordo com a situação patológica (52). Neste trabalho pretendeu-se verificar se o SalivaPrint Toolkit permite a determinação dos perfis totais de proteínas típicas de indivíduos saudáveis, se existe relação com o estado de saúde oral e a variação com a idade e género, com a finalidade de identificar se há proteínas diferentemente expressas e que eventualmente possam servir para caracterizar um estado de saúde saudável e a sua relação com a saúde oral e, por outro lado, estabelecer se o perfil de proteínas é influenciado pela idade e género.

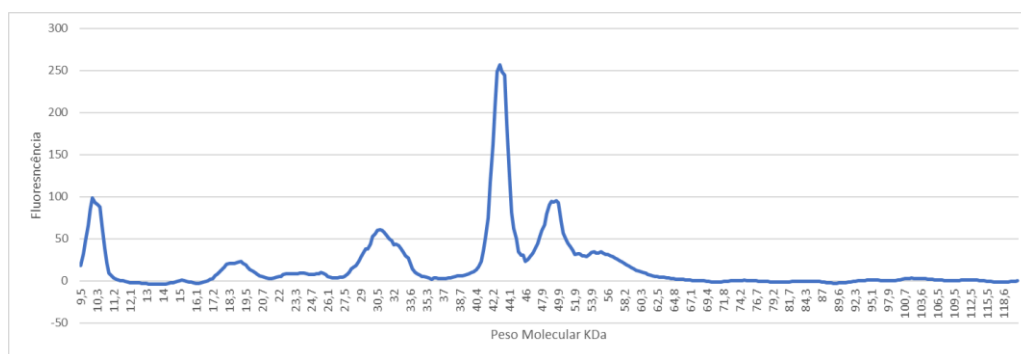


Figura 5- Perfil exemplo resultante da análise do algoritmo SalivaPrint Toolkit

Assim, para a identificação das gamas de proteínas que melhor diferenciam os perfis característicos a análise baseou-se no uso da meia altura referente a cada pico presente no perfil. A meia altura nada mais é que a região do pico onde se encontram as proteínas que mais contribuem para a sua presença e morfologia característica (50).

A determinação da meia altura foi determinada pela seleção do valor do ponto máximo do pico, que corresponde à maior quantidade de fluorescência

detetada. Avaliou-se o peso molecular correspondente ao início e ao fim de cada pico, obtendo-se assim o intervalo de pesos moleculares em que se insere cada pico, posteriormente através da utilização do SalivaPrintToolKit obteve-se a área de cada pico, que será utilizada para a comparação dos mesmos picos de amostras de grupos diferentes e para se determinar as possíveis proteínas presentes nesse intervalo.

7. Avaliação da relação do SalivaPrint com a idade, género e saúde oral.

A relação com a idade, género e saúde oral (37) foi avaliada através duma análise transversal onde associamos estes fatores ao perfil do SalivaPrint.

Para isso, foi realizada uma análise estatística pico a pico de forma a ser detetada ou não uma variação estatisticamente significativa entre cada pico de cada grupo. Esta análise permitiu avaliar quais dos fatores têm impacto no perfil total de proteínas da saliva e, assim, definir um perfil saudável e/ou um perfil de patologia oral característico.

8. Análise estatística dos resultados

Os dados sociodemográficos e de saúde da população foram analisados através de testes não paramétricos: ANOVA, t-teste, Mann-Whitney pelo software IBM SPSS Statistics 24. Foi utilizada uma significância de 95% para todos os parâmetros analisados estatisticamente e sempre que necessário foram identificados e eliminados os “outliers” em cada grupo de estudo.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados e Discussão

1. Caracterização da população

A população amostrada para a realização deste trabalho consistiu em 79 indivíduos, sendo 51 do sexo feminino e 28 do sexo masculino que correspondem a 64,6% e a 35,4% respetivamente como demonstra a Figuras 6.

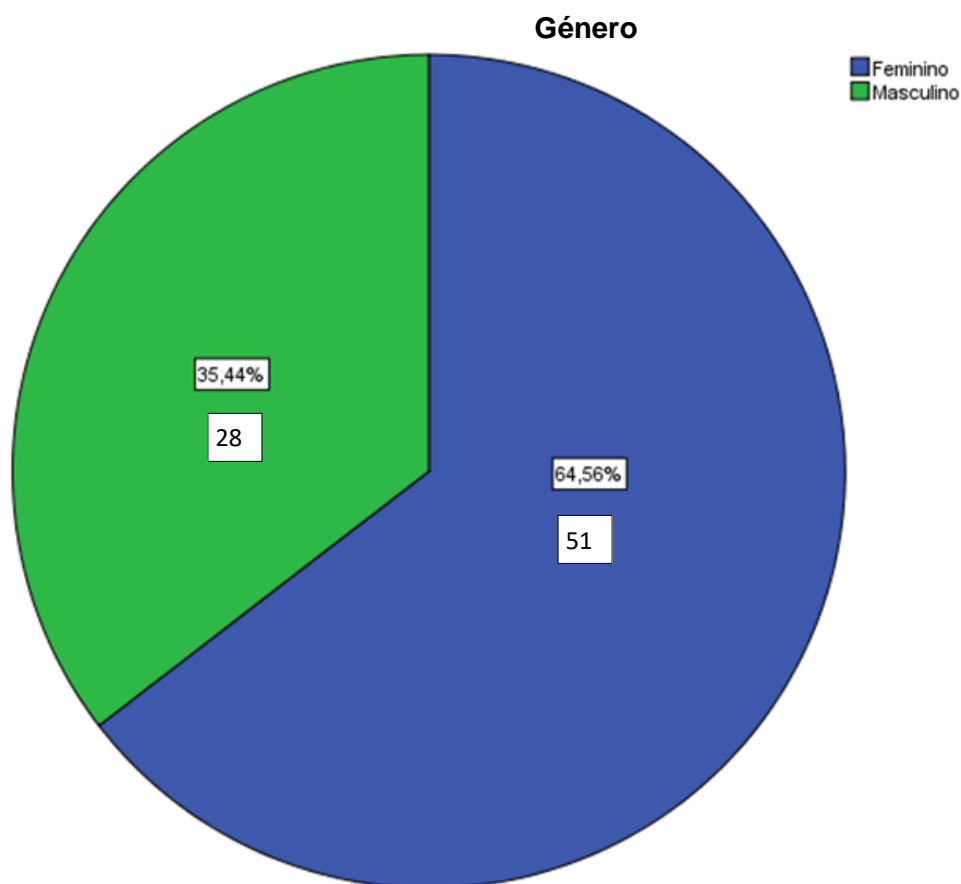


Figura 6- Distribuição de indivíduos da amostra por género (%)

Esta população foi dividida em 3 intervalos de faixa etária (Figura 7) e na sua globalidade apresentou uma média de idades $23,30 \pm 1,306$. O grupo de indivíduos com menos de 13 anos (G1) apresentou idades compreendidas entre os 7 e os 12 anos, com uma média de $8,526 \pm 0,345$, o grupo de indivíduos entre os 13 e os 24 anos (G2) apresentou idades compreendidas entre os 13 e os 24 anos, com uma média de $20 \pm 0,717$, o grupo de indivíduos entre os 25 e os 50 anos (G3 e G6) apresentou

idades compreendidas entre os 25 e os 50anos, com uma média de $34,09 \pm 1,30$ (Figura 8).

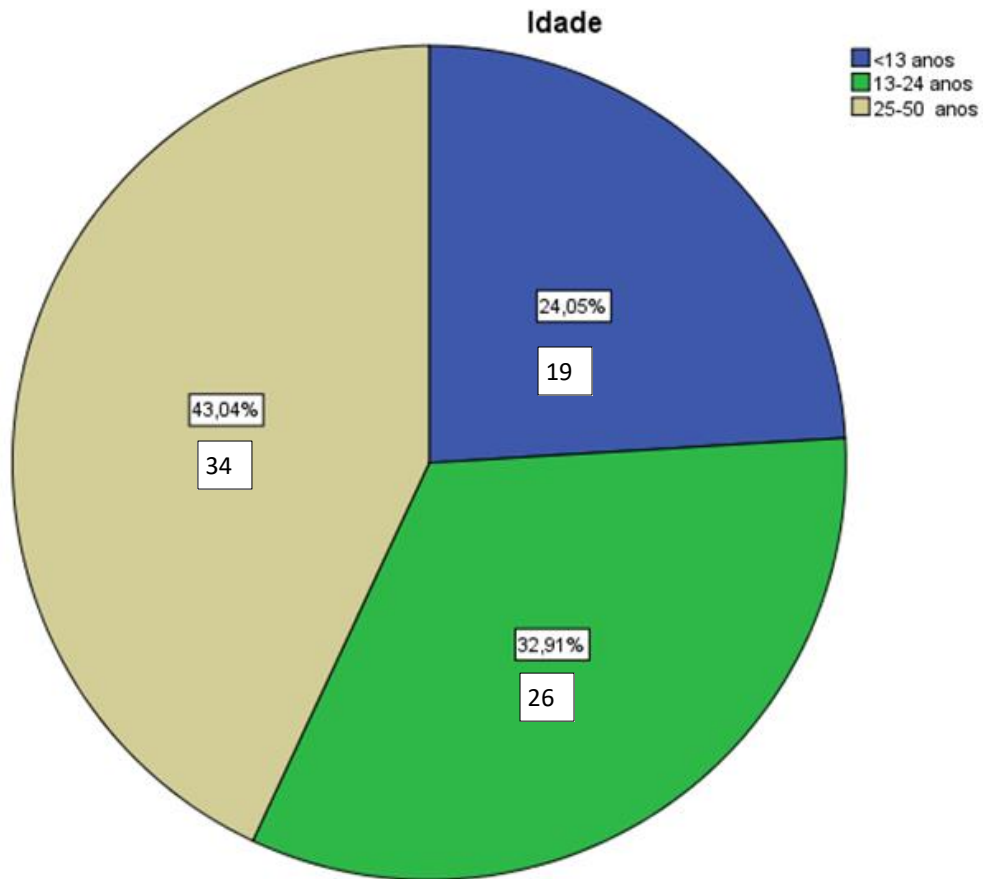


Figura 7- Divisão da amostra total em intervalos de faixa etária

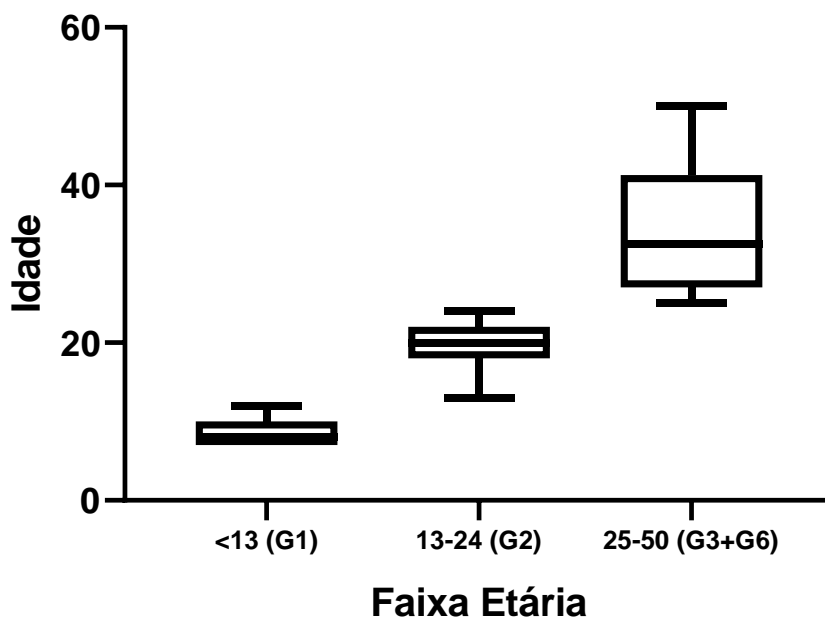


Figura 8- Distribuição das idades por grupo de faixa etária

2. Caracterização do *status* de saúde oral da população

2.1 Índice CPOD

O Índice CPOD é recomendado pela OMS para utilização pela Medicina Dentária de forma a medir e comparar a presença de cárie dentária, sendo os valores possíveis: dentes cariados, perdidos e obturados (70), quando observada uma destas situações, regista-se a quantidade de cada um e os valores são somados para todos os dentes presentes na cavidade oral. Relativamente ao grupo G6 da presente amostra temos uma média de $3,09 \pm 0,433$ com a distribuição apresentada na Tabela 5. Daqui, quantificaram-se o número de cariados, que apresentam entre 1 a 5 cáries ativas no momento da observação (Figura 9), com uma média de $0,34 \pm 0,108$ na amostra total, facto influenciado pela maior parte da população ser saudável do ponto de vista oral. Independentemente de serem saudáveis periodontais, existem 67 indivíduos sem cárie 84,8% (G1, G2 e G3) e 12 com cáries 15,2%, estes últimos estão incluídos no grupo dos 25-50 anos com patologia oral (G6).

Tabela 5- Índice de CPOD correspondente à amostra total e % correspondente

		Frequência	Percentagem
Válido	0	67	84,8
	1	5	6,3
	2	2	2,5
	3	3	3,8
	4	1	1,3
	5	1	1,3
	Total	79	100,0

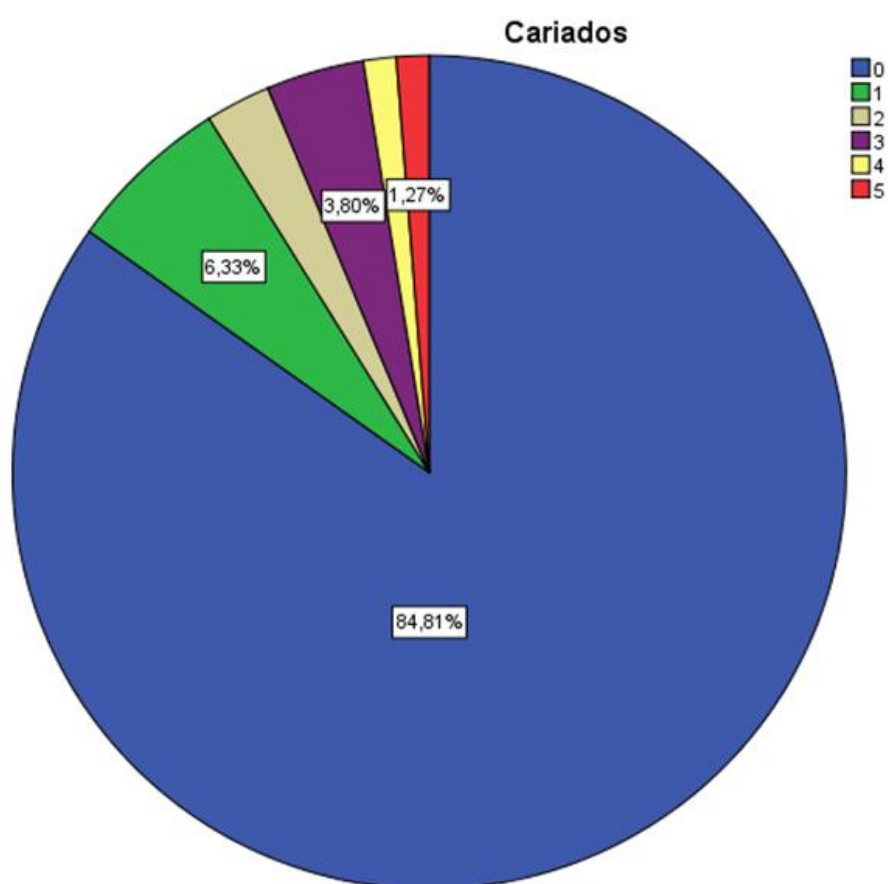


Figura 9- Distribuição do número de cáries na amostra total (%)

2.2 Status Periodontal

Relativamente ao diagnóstico periodontal da população, este foi medido com o índice PSR e temos uma população que se distribui da seguinte forma: 2 com gengivite (2,5%), 8 com periodontite (10,1%) (na faixa etária dos 25-50 anos

G6) e os restantes 69 saudáveis 87,3% do ponto de vista periodontal (Figura 10). Estes, juntamente com o grupo de cariados descrito anteriormente, caracterizam o grupo com patologia oral utilizado para o estudo (G6). Ainda que nesta classificação apareçam saudáveis do ponto de vista periodontal, caso apresentassem cáries, foram incluídos no grupo com patologia oral na análise de grupos.

Ainda que apenas 10 indivíduos tenham patologia periodontal, a população total apresenta uma média de $0,82 \pm 0,121$ para o índice de PSR, e uma distribuição como mostra a Figura 11.

A gengivite e a periodontite são duas doenças inflamatórias crónicas periodontais, que afetam 8 em cada 10 pessoas com idade igual ou superior a 35 anos em toda a Europa, pelo que estão entre as patologias mais comuns(71).

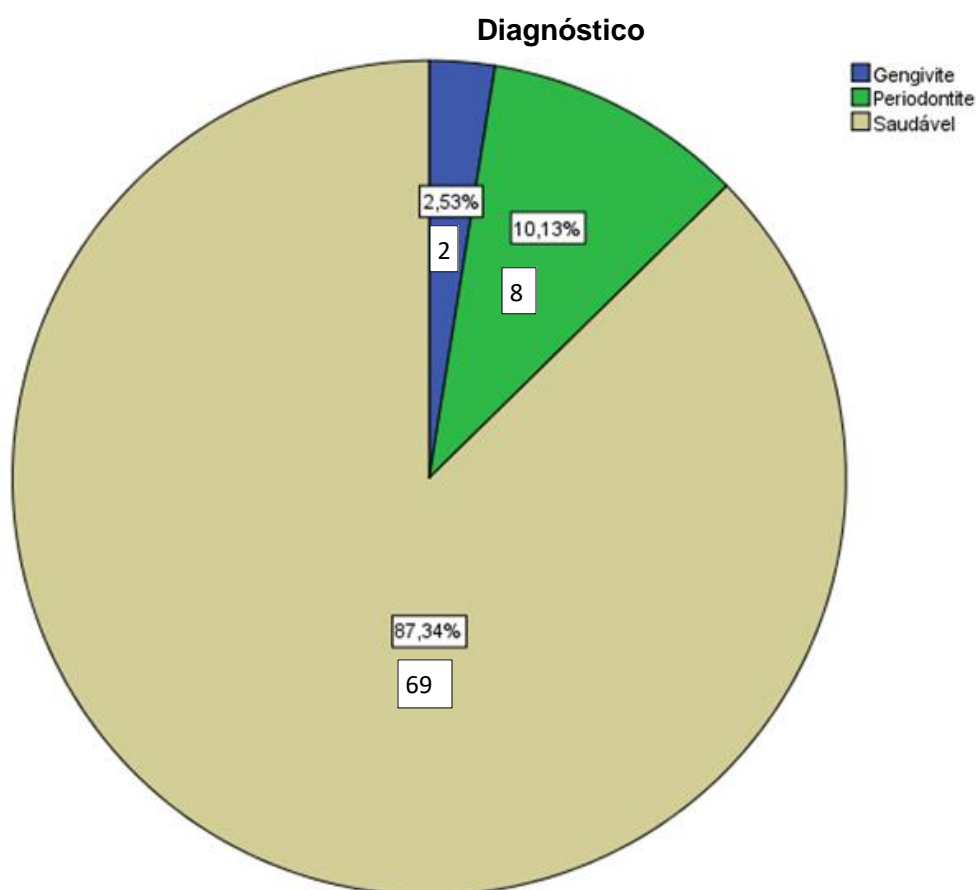


Figura 10- Distribuição do diagnóstico periodontal na amostra total e % correspondente

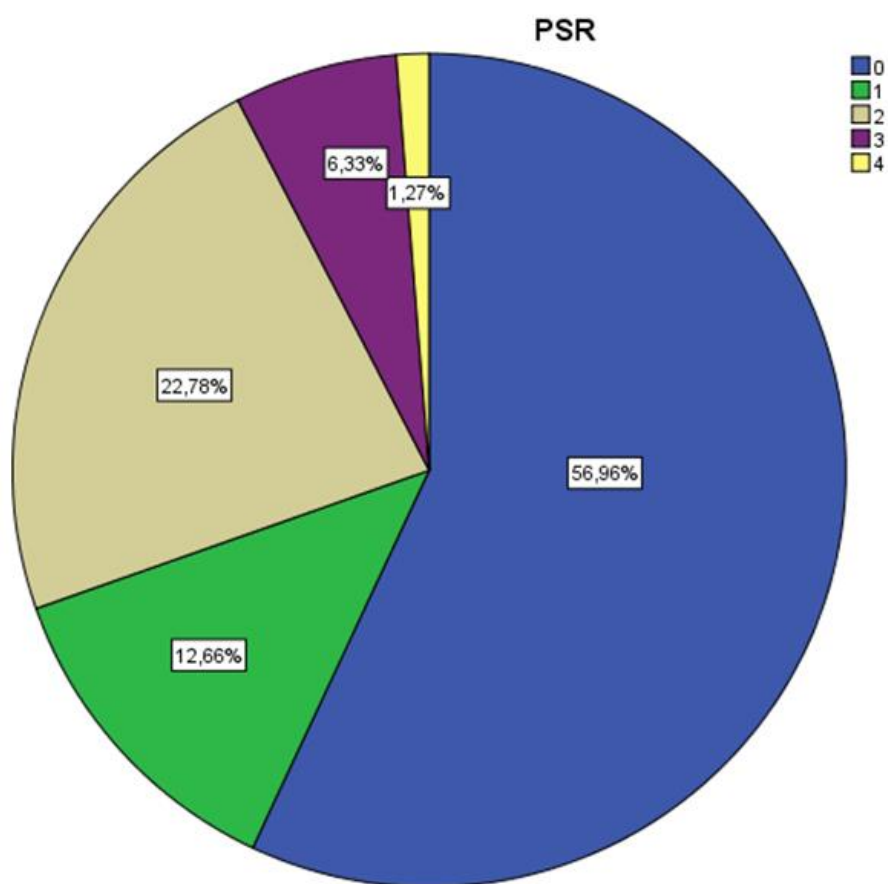


Figura 11- Distribuição dos valores do índice de PSR da amostra total e % correspondente

3 Caracterização da saliva através de parâmetros físico-químicos

Apresentam-se de seguida os resultados relativos à concentração de proteína, pH e fluxo salivar das amostras de saliva obtidas neste estudo. Para simplificação e devido a constrangimentos de tamanho deste documento, apenas serão apresentados os gráficos nos testes em que se observou significância estatística.

3.1 Concentração total de proteína

Primeiramente, testou-se se a concentração total de proteína depende do género, independentemente da idade e do facto de ter ou não patologia oral. A

análise mostrou que este parâmetro não difere, significativamente, com o género ($p=0,219$). Esta informação está de acordo com alguma literatura como Bhuptani et.al, Shivkumar et al e Vibhakar et al, que nos seus estudos não encontraram nenhuma alteração significativa entre a concentração total de proteínas salivares e indivíduos de diferente género (72–74), no entanto Dodds et al. detetaram que o sexo apresenta diferenças significativas com a concentração de proteína salivar (75). No sentido de esclarecer com exatidão como varia esta relação é imprescindível repetir o estudo aumentando o tamanho da amostra, estabelecendo critérios de exclusão muito específicos, para isolar o efeito idade de outros fatores que possam afetar a composição da saliva.

De seguida verificou-se se a concentração total de proteína difere com a idade, independentemente do género e do facto de ter ou não patologia. Verificou-se que a concentração total de proteína difere, significativamente, com a idade ($p=0,006$ e $p=0,10$). Como se observa, nas comparações múltiplas abaixo (Figura 12), o grupo que tem entre 25 e 50 anos (G3 e G6) tem, em média, concentração de proteína total, significativamente mais alta do que quem tem idades inferiores, independentemente de ter ou não patologia oral.

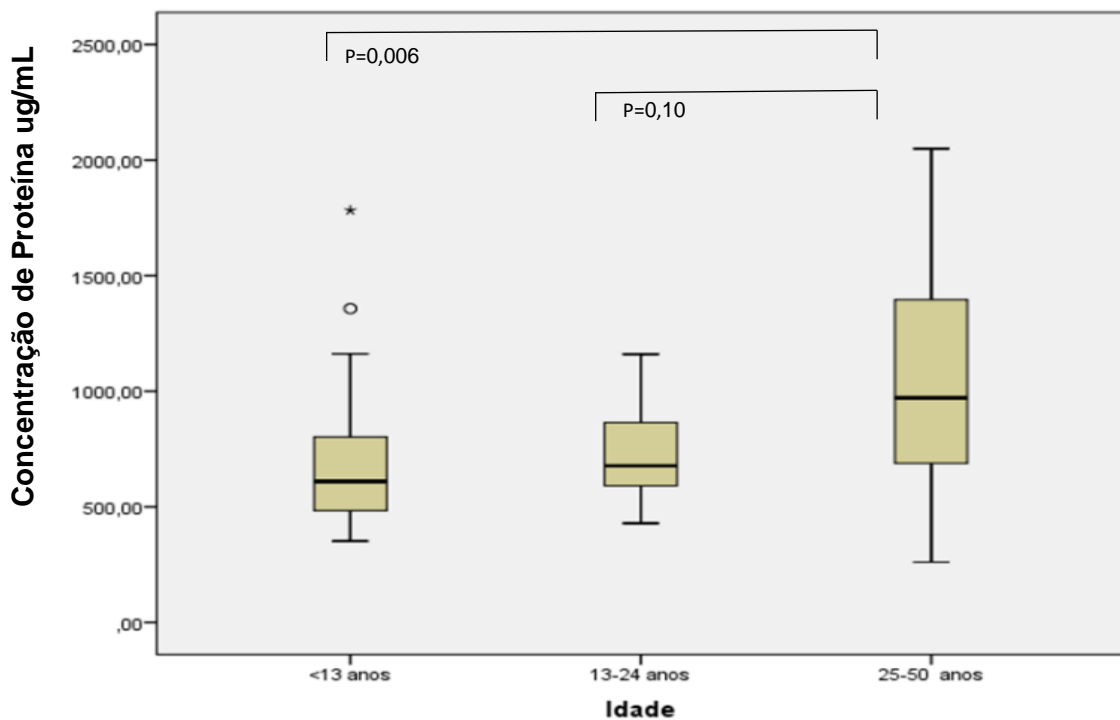


Figura 12- Comparações múltiplas da concentração da proteína total nos diferentes grupos de faixa etária G1, G2 e (G3 + G6); * e ° outliers

Fomos comprovar esta informação comparando apenas os indivíduos saudáveis sistêmicos e orais G1, G2 e G3, as conclusões mantêm-se ($p=0,000$). A concentração de proteína total difere, significativamente, com a idade. Como se pode observar nas comparações múltiplas (Figura 13), o grupo que tem entre 25 e 50 anos G3 tem, em média, concentração de proteína total, significativamente mais alta do que em grupos de faixa etária menor G1 e G2.

Esta informação está de acordo com grande parte das investigações, onde parece observar-se uma correlação positiva entre a idade e a concentração de proteína (72,76). Os indivíduos adultos, possuem uma concentração de proteínas total na saliva maior, que crianças, indicando que há um processo de desenvolvimento e maturação das glândulas salivares durante o processo de crescimento (77). Segundo o estudo de Bhuptani *et al.* a concentração de proteína total aumenta até a meia idade e permanece constante em adultos, diminuindo com o avanço da idade, no entanto no presente estudo não conseguimos confirmar estes dados devido ao intervalo de idade mais maduro terminar nos 50 anos, não tendo sido avaliadas faixas etárias mais elavadas (72).

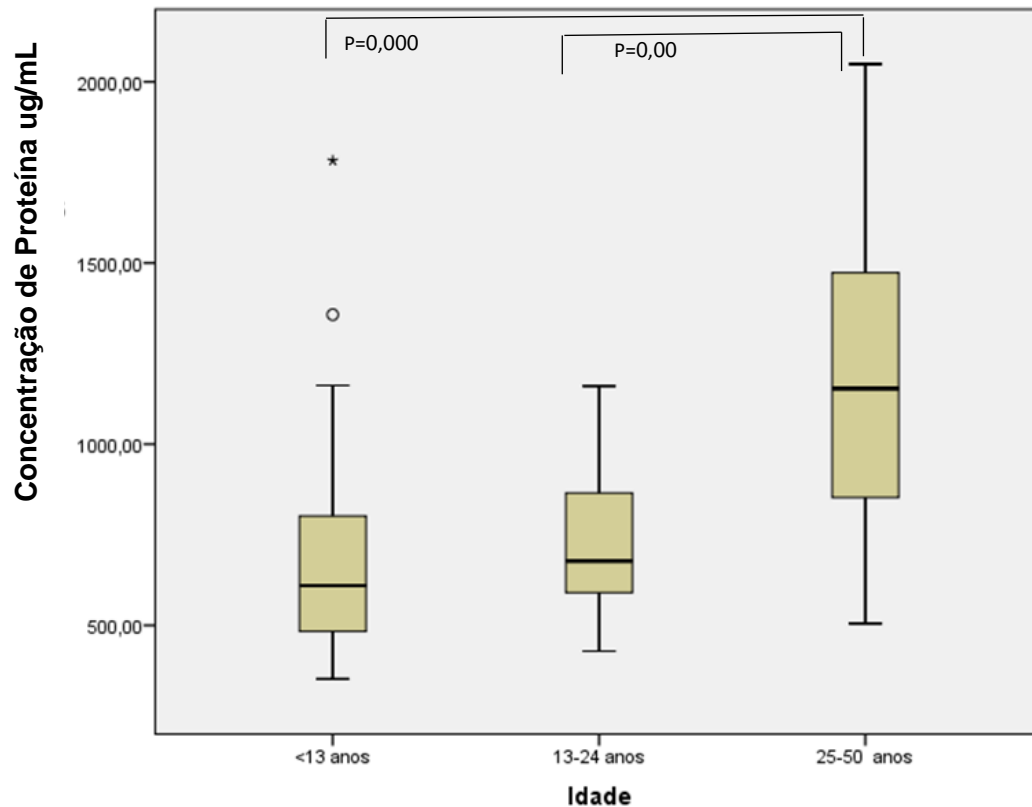


Figura 13- Comparações múltiplas da concentração da proteína total nos diferentes grupos de faixa etária G1, G2 e G3; * e ° outliers

De seguida verificou-se se a concentração total de proteína varia entre os grupos saudáveis orais G1, G2 e G3 e os indivíduos do grupo G6 com patologia periodontal. Esta análise revelou que a concentração total de proteína não difere, significativamente, no grupo com patologia ($p=0,392$).

Avaliou-se ainda a correlação da concentração de proteína dos mesmos grupos com a presença de cárie, esta também não difere, significativamente, com a presença de cárie, ($p=0,353$).

De seguida fez-se a mesma comparação, mas tendo em conta apenas os grupos G3 e G6, ou seja, dentro da mesma faixa etária, mas diferindo pela presença de patologia oral no grupo G6. Observou-se que existe diferença significativa entre G3 e G6, no que respeita à concentração de proteína ($p=0,011$). Em média, os indivíduos saudáveis com 25-50 anos (G3) tem uma concentração de proteína significativamente superior aos que têm patologia oral na mesma faixa etária (G6) (Figura 14).

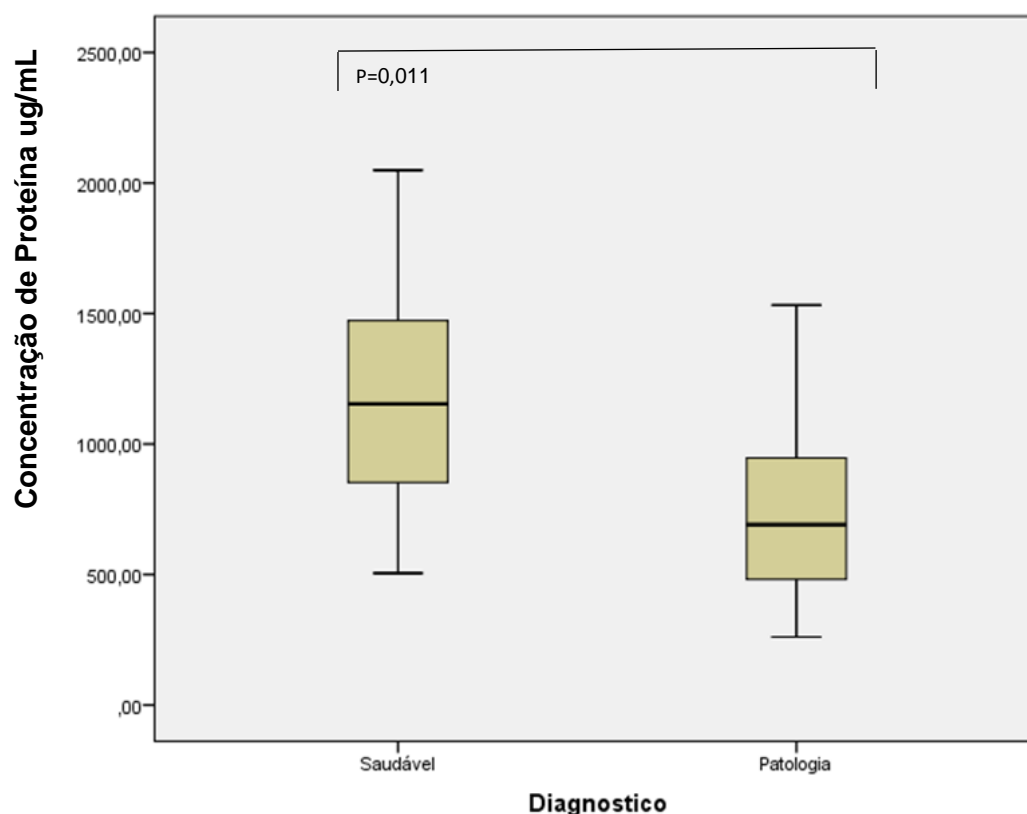


Figura 14- Comparações múltiplas da concentração da proteína total nos grupos para a mesma faixa etária, sem patologia oral (G3) e com patologia oral (G6)

Shaila et al, pelo contrário, detetaram um aumento na concentração de proteína salivar total nos grupos com gengivite e periodontite (78). No estudo conduzido por Henskens et al. também apresentam um aumento do valor de concentração de proteína nos grupos com periodontite e gengivite, quando comparados com os controlos(64). Não se encontrando assim os nossos resultados de acordo com a literatura, sendo necessários mais estudos para avaliar as razões desta discrepância.

3.2 pH

Foi avaliada a relação do pH com a condição oral (doença periodontal e cáries dentárias) na mesma faixa etária G3 vs G6), diferenciados pelo primeiro não possuir patologia oral ao contrário do segundo.

Esta análise demonstrou que o pH não difere, significativamente, em indivíduos com patologia periodontal ($p=0,756$). Assim como também não difere, significativamente com a presença de cárie, ($p =0,099$).

Apesar de no presente estudo não se verificar relação do pH com a doença periodontal nem com as cáries dentárias, existem evidências que afirmam que a capacidade de tampão salivar protege o dente da cárie dentária, e esta por sua vez impede a redução de pH neutralizando os açúcares na cavidade oral (79,80). Por outro lado, na doença periodontal, ocorre maior alcalinização do sulco gengival, elevando o pH acima de 8,0 (81). Galgut tentou correlacionar o pH com gengivite e periodontite. Contudo, as correlações entre o pH e gengivite não foram significativas, mas para a periodontite, foi encontrada significância(82,83). Sewón *et al.* sugere nos seus estudo que alterações no pH na presença de gengivite e periodontite não são tão evidentes como as alterações no fluxo salivar (83,84). Assim, são necessários mais estudos para esclarecer esta relação.

3.2 Fluxo

A taxa de fluxo salivar é considerada o principal fator que afeta a composição eletrolítica, iões inorgânicos como sódio, cloreto, cálcio, potássio, magnésio, bicarbonato, sulfato, tiocianato, fosfato e flúor, da saliva, que são responsáveis pelo equilíbrio osmótico, pela capacidade de tamponamento e remineralização dentária (85).

Relativamente ao fluxo a análise foi feita também apenas para os grupos da mesma faixa etária sem patologia oral (G3) e com patologia oral (G6) e a sua dispersão de valores é observada na Figura 15.

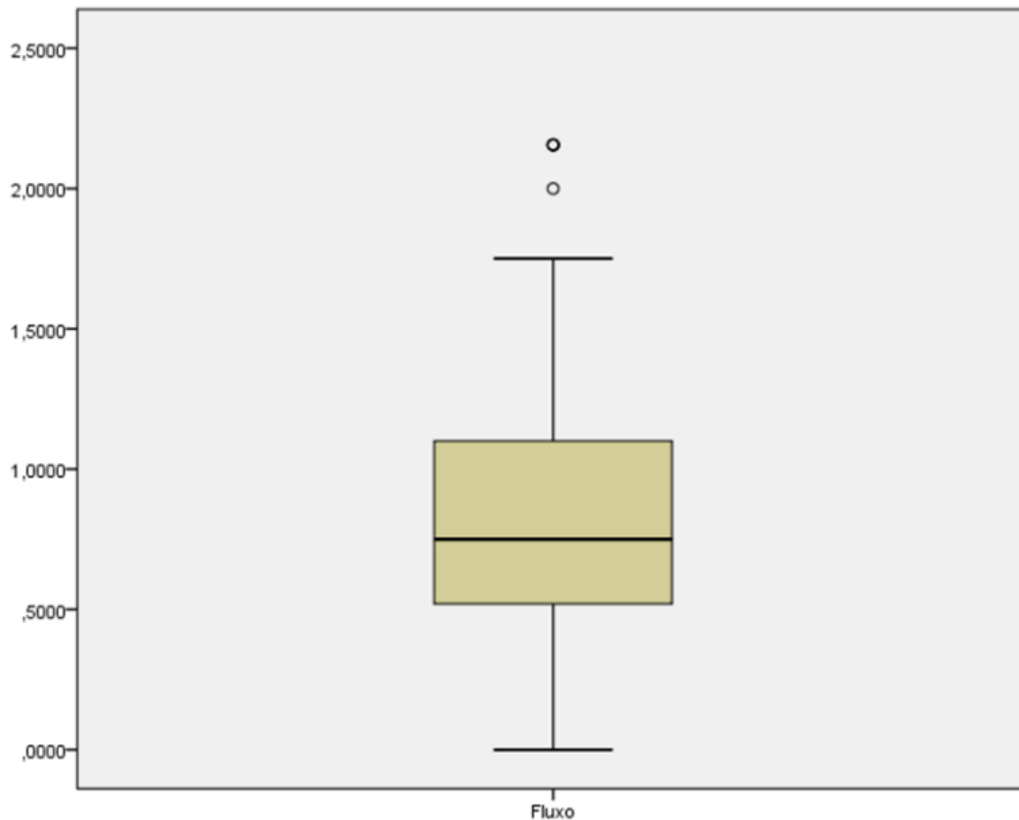


Figura 15- Dispersão dos valores do fluxo para os grupos G3 e G6; * e ° outliers

De acordo com a literatura o fluxo médio diário de saliva total em indivíduos saudáveis varia entre 500 e 1500 mL, informação coincidente com a informação presente neste estudo (85–87) (Figura 15).

Avaliou-se a sua variação para os indivíduos com patologia periodontal, não existindo diferenças significativas no fluxo entre os grupos G3 e G6 ($p=0,359$). Esta observação está em concordância com o estudo de Schutzemberger *et al.* em que foi feita uma análise bioquímica do fluido salivar de indivíduos portadores de doença periodontal e os resultados obtidos para o fluxo salivar nesta investigação, foram considerados normais. Concluíram, portanto, que não há correlação entre o fluxo salivar de indivíduos saudáveis e portadores de patologia periodontal (88). Shaila *et al.* também conclui que a taxa de fluxo salivar não se alterou com o estado periodontal (78).

Comparativamente à presença de cárie, não existem diferenças significativas relativamente ao fluxo, entre o grupo de saudáveis orais G3 e os indivíduos que tem cárie do grupo com patologia oral G6 ($p =0,249$). No entanto sabe-se que a

taxa de fluxo salivar transmite um efeito protetor contra a cárie. Uma taxa de fluxo salivar inferior a 1mL/min é considerada como fator de risco para desenvolver cárie (80,89). Hoolbrook et al e Vehkalahti et al também relataram resultados semelhantes encontrando relações entre a diminuição do fluxo salivar e o aumento de risco de cárie (90,91).

Estudou-se também a relação entre o fluxo salivar e o género, independentemente da idade e do diagnóstico. Verificou-se que não existem diferenças significativas no fluxo entre géneros, no grupo da mesma faixa etária independentemente do diagnóstico ($p=0,443$). O que não se encontra de acordo com a literatura, possivelmente devido ao tamanho reduzido da amostra. Segundo a literatura, a taxa de fluxo de salivar através de uma recolha de saliva não estimulada, é, significativamente menor no género feminino, do que no género masculino (92–94). Scott justificou esta diminuição do fluxo através dum estudo onde relacionava o tamanho das glândulas salivares entre géneros, o género feminino possui glândulas de tamanho inferior(95). Outros estudos relacionaram a taxa de fluxo salivar com o tamanho das glândulas salivares, comprovando que de facto, glândulas salivares de tamanho menor, diminuem consequentemente o fluxo(96–98). Assim, como o género feminino possui glândulas de menor tamanho atribui-lhe uma taxa de fluxo inferior ao género masculino (99). Affo et al realizaram uma meta-análise incluindo todo o trabalho publicado sobre saliva e idade relataram que taxa de fluxo médio de saliva estimulada e não estimulada foram significativamente menores ($p < 0,001$) em adultos mais velhos do que os mais jovens (100). Vandenberghe-Descamps *et al* confirmou esta informação quando comparou idosos saudáveis (70-92 anos) e jovens (22-55 anos) em que observaram uma redução média de 38,5% na taxa de fluxo salivar em idosos em relação aos jovens (101). Neste estudo, não é impossível relacionar essa informação pois os valores de fluxo existiam apenas para o grupo G3 e G6 que pertenciam à mesma faixa- etária.

3.3 Concentração de proteína total vs PSR vs CPOD vs pH vs fluxo salivar

Fez-se ainda uma análise, exclusivamente com o grupo G6 (patologia oral entre os 25-50 anos), de forma a correlacionar todas as variáveis, concentração de proteína total, PSR, CPOD e pH e perceber se existe algum tipo de relação entre elas (Tabela 6). Só se verifica correlação significativa entre concentração de proteína e pH ($p=0,049$). Essa correlação é negativa (-0.756) e forte, indicando que um aumento de concentração de proteína leva a uma diminuição de pH e vice-versa.

Pyati *et al.* num estudo que consistia em medir e comparar os níveis de fluxo salivar, pH, capacidade tampão e proteína total, entre crianças com cárie ativa e livres de cárie, encontraram uma relação de diminuição proporcional ($p < 0,05$) de pH com o aumento proporcional ($p > 0,05$) na concentração de proteína total salivar, em crianças com cárie ativa (102). Corroborando assim, com os nossos resultados.

Para os saudáveis, fez-se o mesmo estudo e não há correlações significativas.

Tabela 6- Correlação de todas as variáveis, concentração de proteína total, PSR, CPOD e pH no grupo com patologia oral G6

		Correlações				
		pH	Concentraçao Proteína	CPOD	PSR	Fluxo
pH	Correlação de Pearson	1	-0,756	0,378	0,632	0,231
	Sig. (bilateral)		0,049	0,404	0,128	0,709
	N	7	7	7	7	5
Concentração Proteína	Correlação de Pearson	-0,756*	1	-0,598	-0,308	-0,276
	Sig. (bilateral)	0,049		0,068	0,386	0,509
	N	7	10	10	10	8
CPOD	Correlação de Pearson	0,378	-0,598	1	0,593	0,112
	Sig. (bilateral)	0,404	0,068		0,071	0,791
	N	7	10	10	10	8
PSR	Correlação de Pearson	0,632	-0,308	0,593	1	,120
	Sig. (bilateral)	0,128	0,386	0,071		0,777
	N	7	10	10	10	8
Fluxo	Correlação de Pearson	0,231	-0,276	0,112	0,120	1
	Sig. (bilateral)	0,709	0,509	0,791	0,777	
	N	5	8	8	8	8

4 Análise do perfil total de proteínas – SalivaPrint com idade, género e saúde oral

Neste capítulo serão demonstrados os perfis resultantes do SalivaPrint dos grupos mencionados anteriormente, representados na Tabela 1. Procedeu-se à determinação dos Perfis Médios correspondentes a cada uma das situações em estudo, delimitaram-se as áreas correspondentes a meia altura de cada pico e obteve-se desta forma o valor da área correspondente ao intervalo de pesos moleculares das proteínas que se encontram mais alteradas (picos mais altos). Esta análise foi efetuada para cada pico de todos os perfis médios obtidos e estes foram comparados entre eles para responder aos objetivos propostos:

- 1) Existe variação do SalivaPrint com a idade e com o género?

2) O perfil de proteínas da saliva por eletroforese capilar (SalivaPrint) relaciona-se com a saúde oral?

4.1. Variação do SalivaPrint com a idade

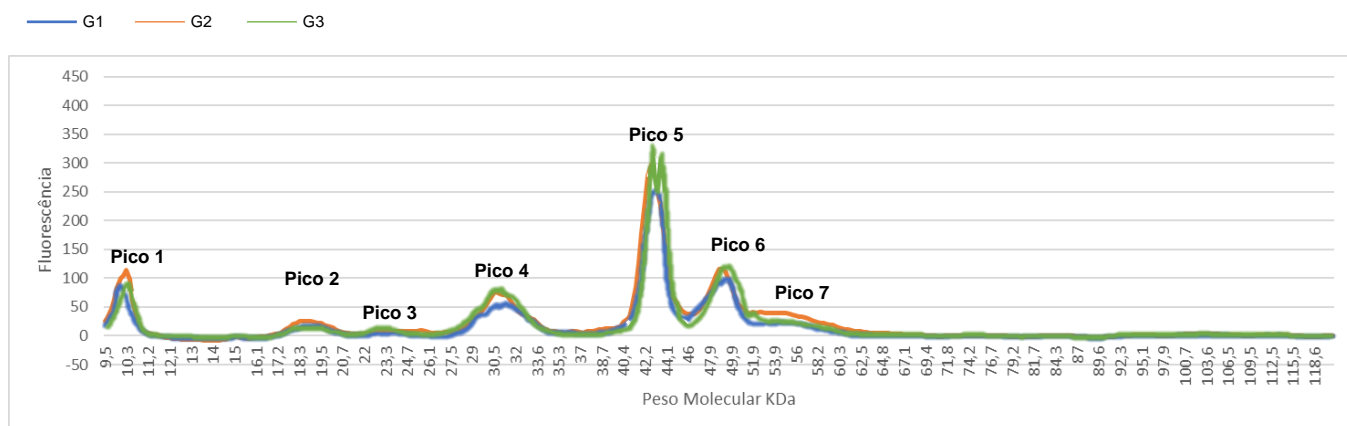


Figura 16- Perfis Médios dos grupos G1, G2 e G3

A figura 16, apresenta o Perfil Médio da população com idade inferior a 13 anos (G1), entre os 13 e os 24 anos (G2) e entre os 25 e os 50 anos (G3. Para verificar se a faixa etária influencia o perfil do SalivaPrint em indivíduos saudáveis sistêmicos e orais, compararam-se os 7 picos do perfil médio dos 3 grupos: G1, G2 e G3. Estas comparações foram feitas pico a pico. Considera-se que o perfil de SalivaPrint difere significativamente, entre os grupos, se o valor de p resultante for inferior ao nível de significância (estipulado a 5%), isto é, se $p \leq 0,05$.

Para o pico 1 ($p=0,347$), o pico 3 ($p=0,055$), o pico 4 ($p=0,570$), o pico 5 ($p=0,963$) e o pico 6 ($p=0,637$), o SalivaPrint não difere significativamente entre os 3 grupos

Para o Pico 2 o grupo 2 apresenta um pico significativamente superior ao do grupo 3 ($p=0,000$) (Figura 17). Ou seja, na faixa etária dos 13 aos 24 anos relativamente à faixa etária dos 25 aos 50 anos observa-se uma alteração nas proteínas com mobilidade eletroforética na gama dos 17 aos 21,6 kDa.

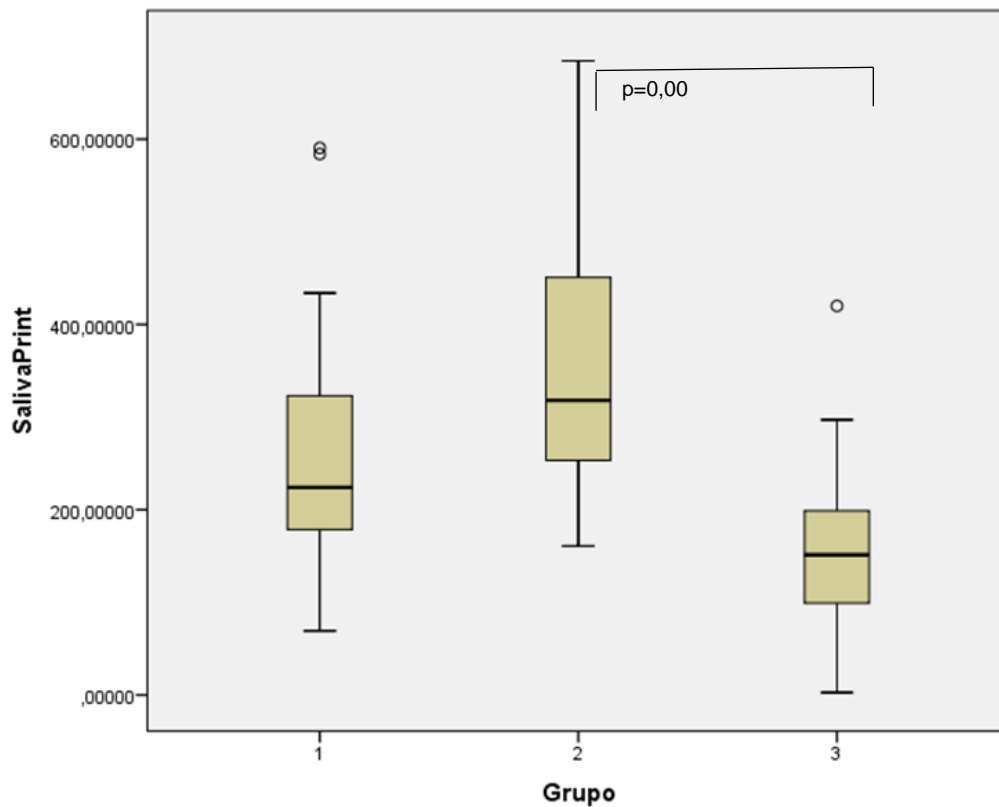


Figura 17- Distribuição dos valores médios do Pico 2 de cada grupo, G1, G2 e G3. ° outliers

E para o pico 7, O grupo 2 apresenta um pico significativamente superior ao do grupo 1 ($p=0,011$) (Figura 18). Ou seja, na faixa etária dos 13 aos 24 anos relativamente à faixa etária dos menores de 13 anos observa-se uma alteração nas proteínas com mobilidade eletroforética na gama dos 51,9 aos 62,9 KDa.

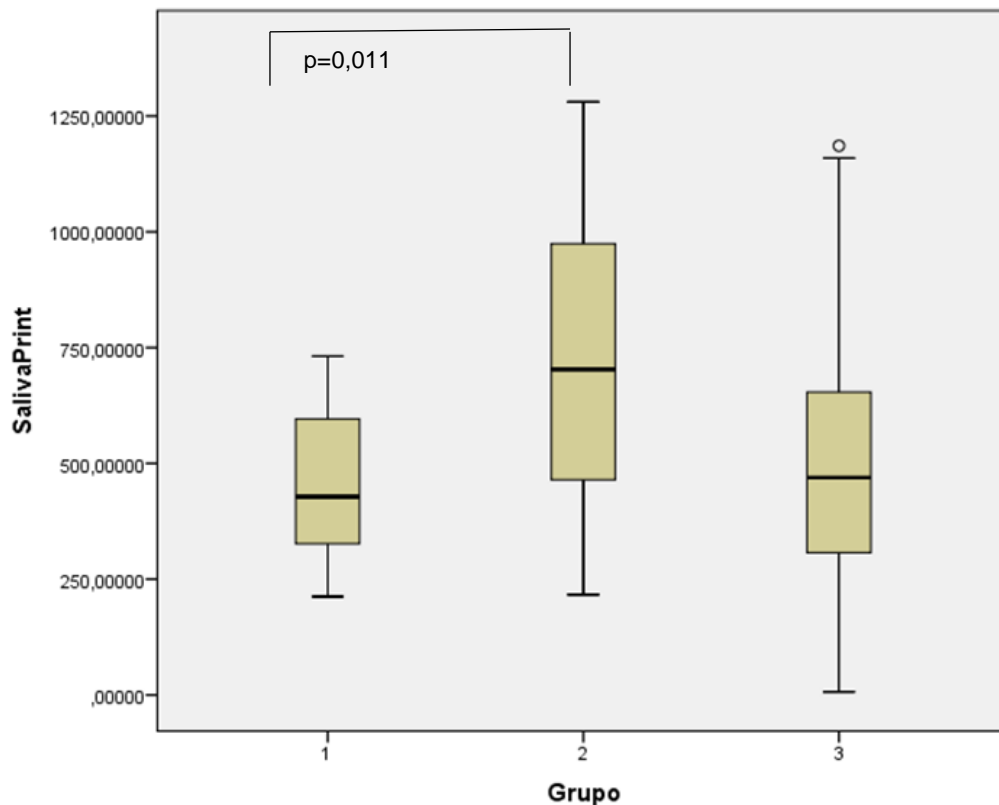


Figura 18- Distribuição dos valores médios do Pico 7 para cada grupo, G1, G2 e G3. ° outliers

4.2 Variação do género

4.2.1 Faixa etária menor que 13 anos

A figura 19, apresenta o Perfil Médio da população com idade menor que 13 anos saudáveis sistémicos e orais do sexo feminino e masculino separadamente, grupo G1F e G1M respetivamente. Para verificar se o género influencia o perfil do SalivaPrint na mesma faixa etária (menos de 13 anos). Estas comparações foram feitas pico a pico.

Considera-se que o perfil SalivaPrint difere significativamente, entre os 2 grupos, se o valor de p resultante, for inferior ao nível de significância (estipulado a 5%), isto é, se $p=0,05$.

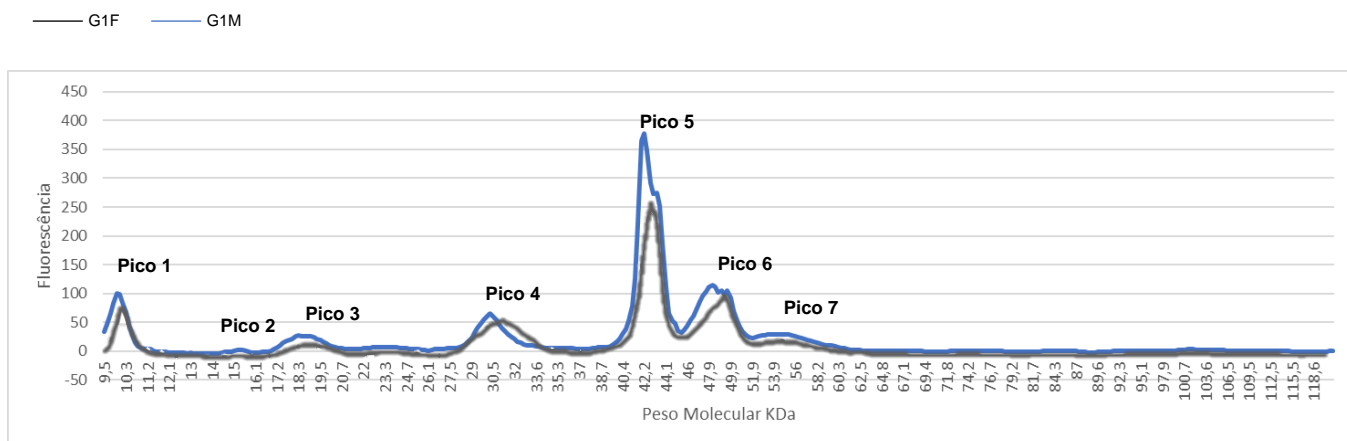


Figura 19- Perfis Médios dos grupos G1F e G1M

Para o pico 1 ($p=0,484$), o pico 2 ($p=0,172$), o pico 3 ($p=0,139$), o pico 4 ($p=0,8534$), o pico 5 ($p=0,684$), o pico 6 ($p=>0,05$) e o pico 7 ($p>0,05$), o SalivaPrint não difere significativamente entre os 2 géneros

4.2.2 Faixa etária entre os 13 e os 24 anos

A figura 20, apresenta o Perfil Médio da população com idade entre 13 e 24 anos saudáveis sistémicos e orais do sexo feminino e masculino separadamente, grupo G2F e G2M respetivamente. Para verificar se o género influencia o perfil do SalivaPrint nesta faixa etária (entre os 13 anos e os 24).

Estas comparações foram feitas pico a pico. Considera-se que o perfil SalivaPrint difere significativamente, entre os 2 grupos, se o valor de p resultante for inferior ao nível de significância (estipulado a 5%), isto é, se $p<0,05$.

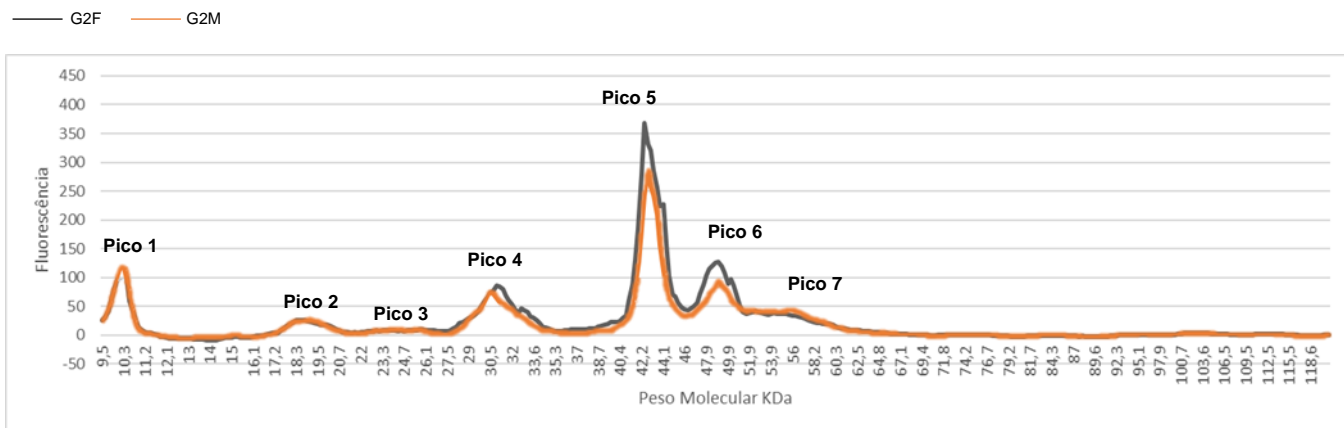


Figura 20- Perfis Médios dos grupos G2F e G2M

Para o pico 1 ($p > 0,05$), o pico 2 ($p > 0,05$), o pico 3 ($p > 0,05$), o pico 4 ($p > 0,05$), o pico 5 ($p > 0,05$), o pico 6 ($p > 0,05$) e o pico 7 ($p > 0,05$), o SalivaPrint não difere significativamente entre os 2 géneros

4.2.3 Faixa etária entre os 25 e os 50 anos

A figura 21, apresenta o Perfil Médio da população com idade entre 25 e 50 anos saudáveis sistémicos e orais do sexo feminino e masculino separadamente, grupo G3F e G3M respetivamente. Para verificar se o género influencia o perfil do SalivaPrint nesta faixa etária (entre os 25 anos e os 50).

Estas comparações foram feitas pico a pico. Considera-se que o perfil SalivaPrint difere significativamente, entre os 2 grupos, se o valor de p resultante for inferior ao nível de significância (estipulado a 5%), isto é, se $p < 0,05$.

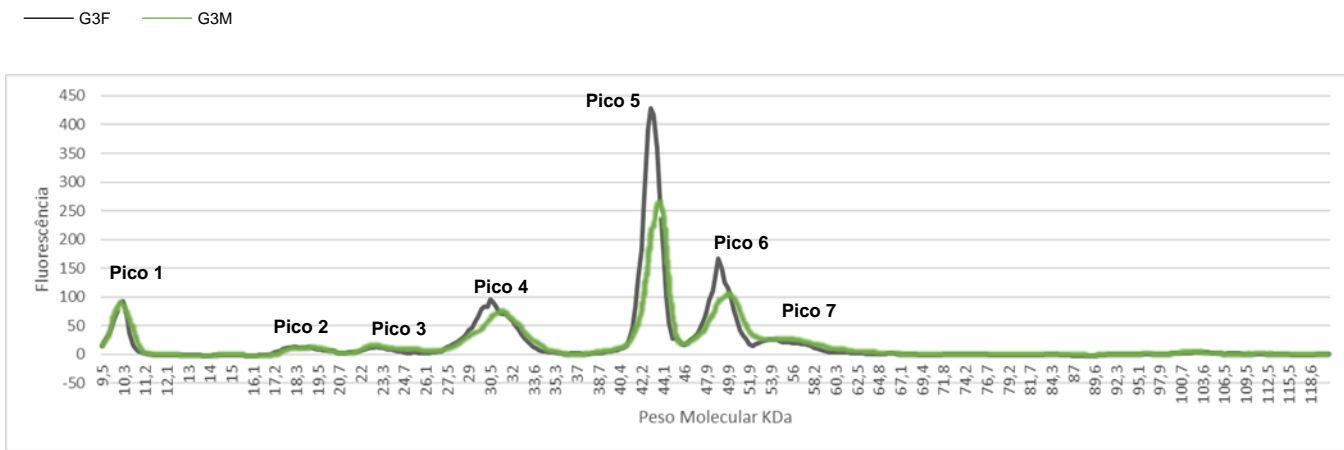


Figura 21- Perfis Médios dos grupos G3F e G3M

Para o pico 1 ($p>0,05$), o pico 2 ($p>0,05$), o pico 3 ($p>0,05$), o pico 4 ($p>0,05$), o pico 5 ($p>0,05$), o pico 6 ($p>0,05$) e o pico 7 ($p>0,05$), o SalivaPrint não difere significativamente entre os 2 géneros.

4.2.3 Todos os indivíduos saudáveis sistémicos e orais, sem divisão por faixa etárias, dos 7 aos 50anos.

A figura 22, apresenta o Perfil Médio da população saudáveis sistémicos e orais, do género feminino e masculino, grupos G4 e G5 respetivamente, independentemente das faixas etárias, dos 7 aos 50anos. Para verificar se o género influencia o perfil do SalivaPrint, independentemente da idade. Iremos comparar os 7 picos do perfil médio dos 2 grupos: G4 e G5. Estas comparações foram feitas pico a pico.

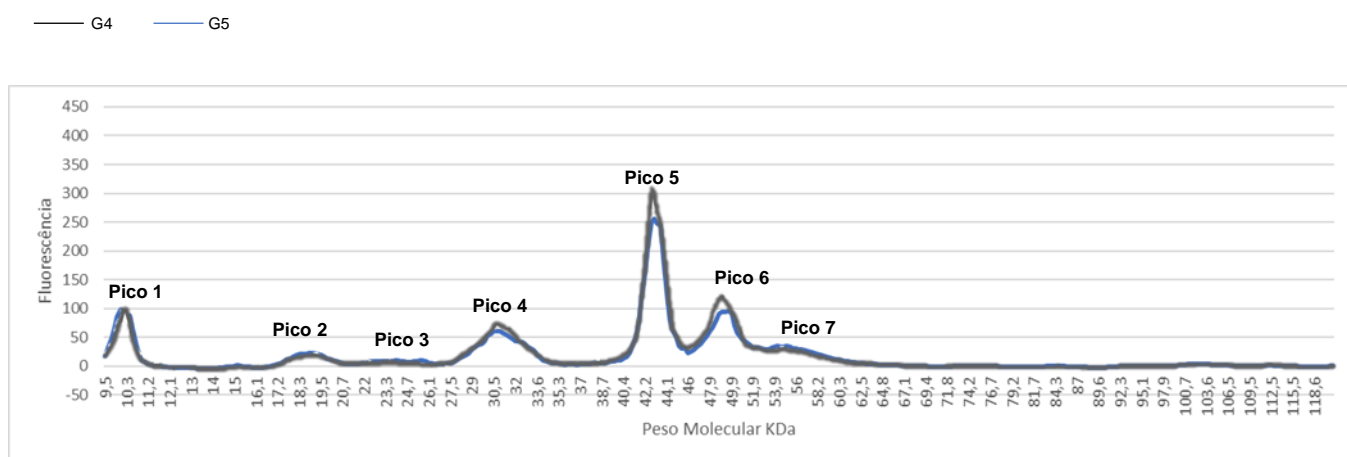


Figura 22- Perfis Médios dos grupos G4 e G5

Para o pico 1 ($p>0,05$), o pico 2 ($p>0,05$), o pico 3 ($p>0,05$), o pico 4 ($p>0,05$), o pico 5 ($p>0,05$), o pico 6 ($p>0,05$) e o pico 7 ($p>0,05$), o SalivaPrint não difere significativamente entre os 2 géneros.

4.3 Variação com a saúde oral

A figura 23, apresenta o Perfil Médio da população com idade entre os 25 e os 50 anos, saudáveis sistêmicos e orais, e saudáveis sistêmicos com patologia oral grupos G3 e G6 respetivamente. Para verificar se a existência de patologia oral influencia o perfil do SalivaPrint, na mesma faixa etária (25-50). Iremos comparar os 7 picos do perfil médio dos 2 grupos: G3 e G6. Estas comparações foram feitas pico a pico.

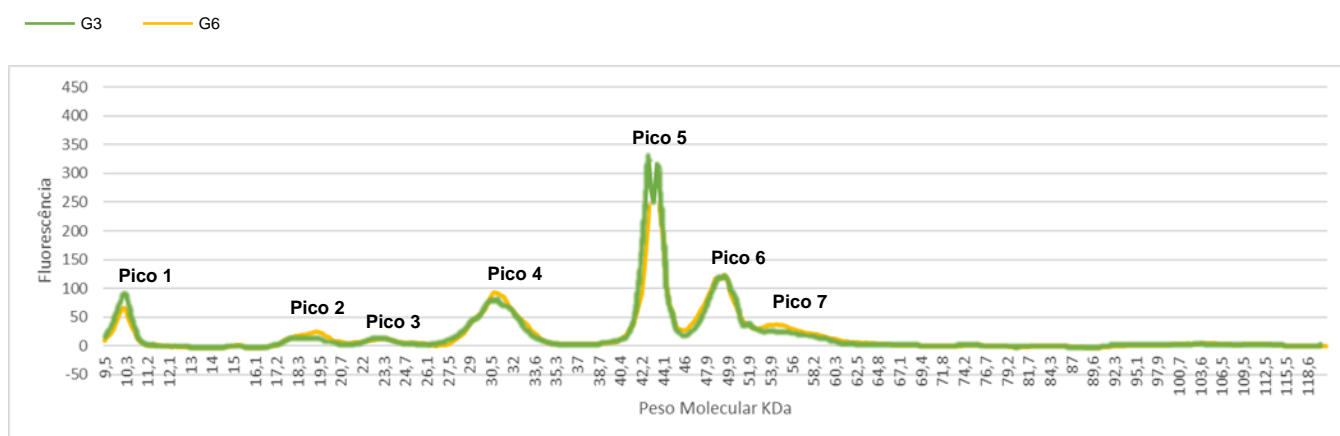


Figura 23- Perfis Médios dos grupos G3 e G6

Para o pico 1 ($p=0,471$), o pico 3 ($p=0,308$), o pico 4 ($p=0,418$), o pico 5 ($p=0,644$), o pico 6 ($p>0,05$) e o pico 7 ($p>0,05$), o SalivaPrint não difere significativamente entre os 2 grupos

Para o Pico 2 o grupo 6 apresenta um pico significativamente superior ao do grupo 3 ($p=0,012$). (Figura 24). Ou seja, na faixa etária dos 25 aos 50 anos com patologia oral, relativamente à mesma faixa etária sem patologia oral, observa-se uma alteração nas proteínas com mobilidade eletroforética na gama dos 17,4 aos 21,3 kD

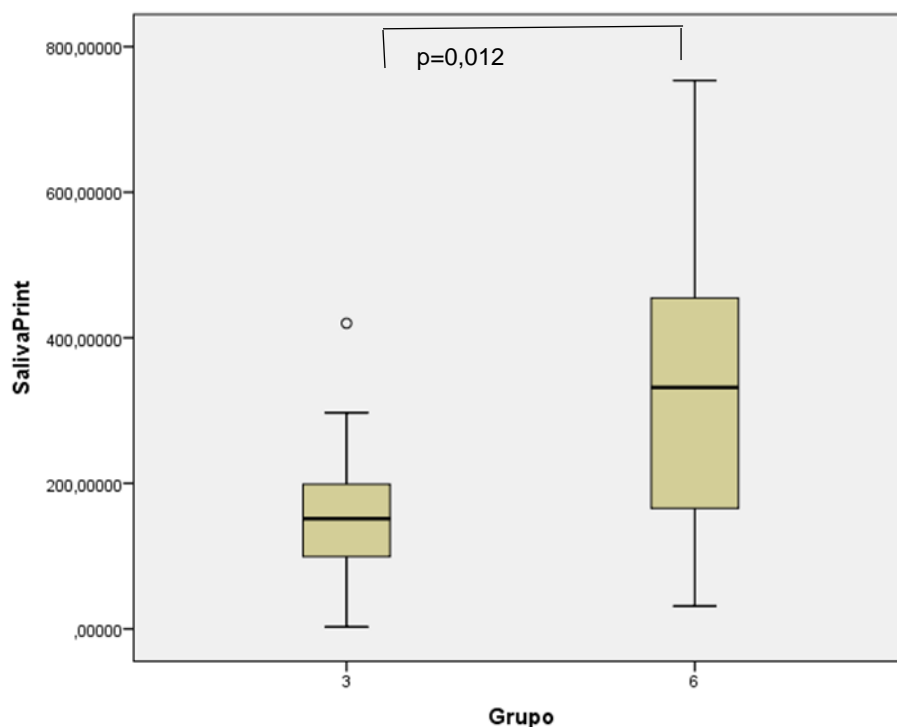


Figura 24- Distribuição dos valores médios do Pico 2 para cada grupo, G3 e G6. ° outliers

4.3 Limitações do estudo

Após a realização do presente estudo e dos objetivos cumpridos, no sentido de melhores estudos futuros, podemos identificar como principais limitações:

- Complexidade em encontrar indivíduos totalmente saudáveis sistemicamente e/ou oralmente, principalmente em faixas etárias mais adultas;
- O horário da recolha da amostra é limitado de forma a evitar alterações pelo ritmo circadiano, no entanto dificulta a disponibilidade dos indivíduos na sua realização;
- O número de participantes no estudo deveria ser mais alargado principalmente para aumentar a representatividade das populações observadas;

- A saúde sistémica foi auto relatada pelos participantes e, idealmente, deveria ser fornecida pelo médico de família ou por exames complementares de diagnóstico;
- A não utilização de exames complementares de diagnóstico, nomeadamente, análise radiográfica, pode ter resultado na identificação errada dos dentes cariados e obturados e, em consequência, do índice CPOD bem como do diagnóstico periodontal. No entanto, a maioria dos estudos utilizados para comparação destes valores utilizou uma metodologia semelhante.
- Como o SalivaPrint é um método novo, ainda nas fases iniciais de desenvolvimento, ainda não existem muitos estudos sobre este tema com os quais se possam comparar resultados.
- No caso da análise do SalivaPrint as comparações deveriam ter em conta todo o perfil e não apenas os 7 principais picos observados. Isto deve-se à falta de estratégias de análise de perfis eletroforéticos que tenham em conta a totalidade do perfil. De futuro está previsto o desenvolvimento de estratégias bioinformáticas para fazer estas comparações.

IV. CONCLUSÃO

Conclusão

Neste trabalho verificou-se que existem alterações do SalivaPrint com a idade, nomeadamente para o pico 2, no qual o grupo 2 apresenta um pico significativamente superior ao do grupo 3. Ou seja, na faixa etária dos 13 aos 24 anos relativamente à faixa etária dos 25 aos 50 anos observa-se uma alteração nas proteínas com mobilidade eletroforética na gama dos 17 aos 21,6 kDa. Relativamente ao pico 7, o grupo 2 apresenta um pico significativamente superior ao do grupo 1, ou seja, na faixa etária dos 13 aos 24 anos relativamente à faixa etária dos menores de 13 anos observa-se uma alteração nas proteínas com mobilidade eletroforética na gama dos 51,9 aos 62,9 KDa.

Em relação com o género não foram encontradas variações no SalivaPrint.

Verificou-se também, que existem alterações do SalivaPrint com a saúde oral, nomeadamente para o pico 2, no qual o grupo 6 apresenta um pico significativamente superior ao do grupo 3. Ou seja, na faixa etária dos 25 aos 50 anos com patologia oral, relativamente à mesma faixa etária sem patologia oral, observa-se uma alteração nas proteínas com mobilidade eletroforética na gama dos 17,4 aos 21,3 kD.

Relativamente à relação dos parâmetros físico-químicos da saliva apurou-se que a concentração total de proteína não difere, significativamente, com o género, no entanto difere, significativamente, com a idade. Verificou-se que a concentração total de proteína do grupo que tem entre 25 e 50 anos tem concentração de proteína total significativamente mais alta do que quem tem idades inferiores. Na faixa etária entre os 25-50 anos o indivíduo saudável tem uma concentração de proteína significativamente superior aos que têm patologia oral.

No que se refere ao pH, este não difere, significativamente, em indivíduos com patologia periodontal. Assim como também não difere, significativamente com a presença de cárie.

Analogamente não foram encontradas diferenças significativas no fluxo com patologia periodontal. Assim como também não difere, significativamente com a presença de cárie nem entre géneros.

Verificou-se ainda que um aumento na concentração de proteína, leva a uma diminuição de pH e vice-versa.

Apesar dos resultados indicarem algumas alterações estatisticamente significativas nos perfis de proteína total da saliva nas diferentes situações, para que esta informação possa ser utilizada para diagnóstico é importante saber quais as proteínas que estão relacionadas com estas alterações. Isso pode ser possível utilizando estratégias bioinformáticas que recorram à base de dados SalivaTecDB para saber quais as proteínas com mobilidade eletroforética nas gamas de pesos moleculares identificadas como alteradas. Este tipo de estratégias está atualmente em desenvolvimento no SalivaTec.

Uma vez que se observaram diferenças nos perfis de proteínas da saliva de pessoas saudáveis, é importante ter esse facto em conta aquando da comparação com indivíduos doentes para isolar o efeito da doença dos efeitos de outros parâmetros (como a idade).

Este tipo de trabalhos, é essencial para encontrar formas menos invasivas de diagnóstico que tenham em conta toda a variabilidade molecular e fisiológica do indivíduo.

V. BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. WHO | World Health Organization. WHO [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 7]; Available from: https://www.who.int/oral_health/en/
2. Glick M, Silva OM da, Seeberger G, Xu T, Pucca G, Williams D, et al. Conduzir o Mundo a uma Ótima Saúde Oral FDI Visão 2020 Uma reflexão sobre o futuro da saúde oral. 2012; Available from: <https://www.ond.pt/noticias/2012/09/fdivisao2020pt.pdf>
3. Objectives and rationale Vision 2020 Think Tank A new definition for oral health A New Definition of Oral Health: Executive summary [Internet]. [cited 2019 Jan 19]. Available from: www.fdiworldental.org
4. Cáries dentárias: a doença não contagiosa mais comum do mundo - Saúde Oral [Internet]. [cited 2019 Jan 20]. Available from: <https://www.saudeoral.pt/medicos-dentistas/caries-dentarias-a-doenca-nao-contagiosa-mais-comum-do-mundo/>
5. Fejerskov O, Kidd with Bente Nyvad E, Baelum V. Dental Caries: The Disease and its Clinical Management. Second Edition [Internet]. [cited 2019 May 15]. Available from: [http://the-eye.eu/public/Books/BioMed/Dental Caries - The Disease and its Clinical Management 2nd ed - O. Fejerskov%2C E. Kidd %28Blackwell%2C 2008%29 WW.pdf](http://the-eye.eu/public/Books/BioMed/Dental%20Caries%20-%20The%20Disease%20and%20its%20Clinical%20Management%202nd%20ed%20-%20O.%20Fejerskov%20&%20E.%20Kidd%20-%20Blackwell%202008%29%20WW.pdf)
6. Philip Marsh MVM. Oral Microbiology. 4th ed. Oxford; 1999.
7. Lamont RJ, Eglund PG. Dental Caries. Mol Med Microbiol Second Ed. 2014;2–3(4):945–55.
8. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. Caries Res. 2004;38(3):182–91.
9. Sci JM. The Psychosocial Consequences for. J Med. 2007;15(1):353–62.
10. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS. Salivary biomarkers for dental caries. Periodontol 2000. 2016;70(1):128–41.
11. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? Caries Res. 2004;38(3):247–53.
12. Rudney JD, Staikov RK, Johnson JD. Potential biomarkers of human salivary function: A modified proteomic approach. Arch Oral Biol. 2009;54(1):91–100.
13. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining Salivary Biomarkers Using Mass Spectrometry-Based Proteomics: A Systematic Review. Omi A J Integr Biol. 2011;15(6):353–61.
14. Wang K, Zhou X, Li W, Zhang L. Human salivary proteins and their peptidomimetics: Values of function, early diagnosis, and therapeutic

- potential in combating dental caries. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2019;99(14):31–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.12.009>
15. L. Ziukaite, D.E. Slrot FAV der W. Prevalence of diabetes mellitus in people clinically diagnosed with periodontitis: a systematic review and metaanalysis of epidemiologic studies. *J Clin Periodontol*. 15:3218–3221.
 16. Sumadhura C, Prasanna JS, Sindhura C, Karunakar P. Evaluation of periodontal response to nonsurgical therapy in pre- and post-menopausal women with periodontitis. *Indian J Dent Res* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 23];29(3):298–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29900912>
 17. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2019 May 25];35:346–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-051X.2008.01280.x>
 18. Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2019 May 25];32(s6):132–58. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-051X.2005.00799.x>
 19. J. Wennström JL. Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health: healing following excisional and grafting procedures in dogs. *J Clin Periodontol*. 1983;
 20. Souza PPC, Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hänström L, Souza JAC, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit the expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 in fibroblasts. *Mol Immunol* [Internet]. 2012;49(4):601–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2011.10.009>
 21. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*. 2004;32(7):511–20.
 22. Haase HR, Clarkson RW, Waters MJ, Bartold PM. Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan synthesis by human periodontal fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1998;174(3):353–61.
 23. Lee HJ, Kim JK, Cho JY, Lee JM, Hong SH. Quantification of subgingival bacterial pathogens at different stages of periodontal diseases. *Curr Microbiol*. 2012;65(1):22–7.
 24. Sugawara S, Sasano T, Takada H. Toll-like Receptors, NOD1, and NOD2 in Oral Epithelial Cells. *J Dent Res*. 2006;524–9.
 25. W. Müller-Glauser HS. Exfoliative cytology and ultrastructure of superficial epithelial cells from the normal human oral stratified epithelia. *J Biol Buccale*. 1983;11:317–26.
 26. Abreu LMG, Lopes FF, Pereira A de FV, Pereira ALA, Alves CMC. Doença Periodontal e condições sistêmicas: mecanismos de interação. *Rev Pesqui em Saúde*. 2010;11(2):52–5.

27. Newman, Michael G. Takei, Henry Klokkevold, Perry R. Carranza FA. *Periodontia Clinica*. 10th editi. Koogan G, editor. Rio de Janeiro; 2007.
28. Fernández-Rojas B, Gutiérrez-Venegas G. Flavonoids exert multiple periodontic benefits including anti-inflammatory, periodontal ligament-supporting, and alveolar bone-preserving effects. *Life Sci*. 2018;209(August):435–54.
29. Dörfer C, Benz C, Aida J, Campard G. The relationship of oral health with general health and NCDs: a brief review. *Int Dent J [Internet]*. 2017 Oct [cited 2019 Jan 20];67:14–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/idj.12360>
30. Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT. Saliva diagnostics - Current views and directions. *Exp Biol Med (Maywood) [Internet]*. 2017 [cited 2019 Jan 20];242(5):459–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27903834>
31. Malathi N, Mythili S, Vasanthi HR. Salivary diagnostics: a brief review. *ISRN Dent [Internet]*. 2014 Jan 29 [cited 2019 Jan 20];2014:158786. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616813>
32. Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, et al. Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life [Internet]*. 2009 [cited 2019 Jan 20];2(2):124–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20108531>
33. Rosa N, Marques J, Esteves E, Fernandes M, Mendes VM, Afonso Â, et al. Protein Quality Assessment on Saliva Samples for Biobanking Purposes. *Biopreserv Biobank*. 2016;14(4):289–97.
34. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. *Clin Chem*. 2011;57(5):675–87.
35. Lim P, Garssen J, Sandalova E. Potential use of salivary markers for longitudinal monitoring of inflammatory immune responses to vaccination. *Mediators Inflamm*. Hindawi Publ Corp. 2016;2016.
36. Dhima M, Salinas TJ, Wermers RA, Weaver AL, Koka S. Preference changes of adult outpatients for giving saliva, urine and blood for clinical testing after actual sample collection. *J Prosthodont Res*. 2013;
37. Castagnola M, Scarano E, Passali GC, Messana I, Cabras T, Iavarone F, et al. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. *Acta Otorhinolaryngol Ital [Internet]*. 2017 Apr [cited 2019 Jun 1];37(2):94–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28516971>
38. Murr A, Pink C, Hammer E, Michalik S, Dhople VM, Holtfreter B, et al. Cross-Sectional Association of Salivary Proteins with Age, Sex, Body Mass Index, Smoking, and Education. *J Proteome Res*. 2017;16(6):2273–81.
39. Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, Fanali C, Fiorita A, Cabras T, et

- al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngol Ital* [Internet]. 2011 Dec [cited 2019 Jun 1];31(6):347–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22323845>
40. Amado FML, Ferreira RP, Vitorino R. One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clin Biochem* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2019 May 19];46(6):506–17. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912012005796?via%3Dihub>
 41. APRILL C. The Genetic Association Database. *Spine J*. 2004;4(3):368–9.
 42. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2019 May 19];42(D1):D68–73. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt1181>
 43. Arrais JP, Rosa N, Melo J, Coelho ED, Amaral D, Correia MJ, et al. OralCard: A bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2019 May 19];58(7):762–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996913000034?via%3Dihub>
 44. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (80-) [Internet]. 2015 Jan 23 [cited 2019 May 19];347(6220):1260419–1260419. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25613900>
 45. Wong DTW. Salivaomics. *J Am Dent Assoc* [Internet]. 2012 Oct [cited 2019 May 19];143(10 Suppl):19S-24S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034834>
 46. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Lopes P, Melo J, Oliveira JL, et al. From the salivary proteome to the OralOme: Comprehensive molecular oral biology. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2019 May 19];57(7):853–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996912000027?via%3Dihub>
 47. Armirotti A, Damonte G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2019 Jun 2];10(20):3566–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201000245>
 48. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Trovó de Marqui AB, Tajara EH. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2012 May [cited 2019 Jun 2];58(3):366–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0104423012705237>
 49. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* [Internet]. 2014;509(7502):582–7. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24870543>

50. Cruz I, Esteves E, Fernandes M, Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, et al. SalivaPRINT Toolkit – Protein profile evaluation and phenotype stratification. *J Proteomics*. 2018;171(June):81–6.
51. J.M. Walker, ed. *The Proteomics Protocols Handbook* [Internet]. Humana Press. 2005 [cited 2018 Aug 3]. Available from: [/www.springer.com/gp/book/9781588293435](http://www.springer.com/gp/book/9781588293435)
52. Eduardo J. Esteves, Cruz IN, Silva MS, Fernandes MF, Rosa NR, Correia MJ, et al. DMT2-SalivaPRINT: A protein profiling strategy for Diabetes Mellitus Type 2 applications. submetido.
53. Qin Y, Zhong Y, Zhu M, Dang L, Yu H, Chen Z, et al. Age- and sex-associated differences in the glycopatterns of human salivary glycoproteins and their roles against influenza A virus. *J Proteome Res*. 2013;12(6):2742–54.
54. Vigneswaran N, Zhao W, Dassanayake A, Muller S, Miller DM, Zacharias W. Variable expression of cathepsin B and D correlates with highly invasive and metastatic phenotype of oral cancer. *Hum Pathol*. 2000;31(8):931–7.
55. Averna M, De Tullio R, Capini P, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E. Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: A new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(12):2669–78.
56. Turato C, Pontisso P. SERPINB3 (Serpine Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 3). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2015;(3):1–14.
57. Fleissig Y, Reichenberg E, Redlich M, Zaks B, Deutsch O, Aframian DJ, et al. Comparative proteomic analysis of human oral fluids according to gender and age. *Oral Dis*. 2010;16(8):831–8.
58. Helenius A. Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science* (80-) [Internet]. 2002;291(5512):2364–9. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
59. Sun S, Zhao F, Wang Q, Zhong Y, Cai T, Wu P, et al. Analysis of age and gender associated N-glycoproteome in human whole saliva. *Clin Proteomics* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 16];11(1):25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24994967>
60. Wang Z, Wang Y, Liu H, Che Y, Xu Y, E L. Age-related variations of protein carbonyls in human saliva and plasma: is saliva protein carbonyls an alternative biomarker of aging? *Age (Dordr)* [Internet]. 2015 Jun [cited 2019 Jun 3];37(3):9781. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25943699>
61. Cabras T, Pisano E, Boi R, Olianias A, Manconi B, Inzitari R, et al. Age-Dependent Modifications of the Human Salivary Secretory Protein Complex. *J Proteome Res* [Internet]. 2009 Aug 7 [cited 2019 Jul

- 25];8(8):4126–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19591489>
62. Prodan A, Brand HS, Ligtenberg AJM, Imangaliyev S, Tsvitsivadze E, van der Weijden F, et al. Interindividual variation, correlations, and sex-related differences in the salivary biochemistry of young healthy adults. *Eur J Oral Sci.* 2015;123(3):149–57.
 63. Fortin M-F. O processo de investigação: da concepção à realização. 1^a. Científicas L-E técnicas e, editor. 1999. 379p p.
 64. Y. M. C. Henskens, U. van der Velden, E. C. I. Veerman AVNA. Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis or periodontitis. *Periodont Res.* 1993;28:43–8.
 65. E K. Princípios da Ciência Neural. McGraw-Hil. Kandel E., Schwartz J., J. Jessell, Sielgelbaum S. HA, editor. Nova York, EUA; 2013.
 66. Oral Health Surveys Basic Methods. 2013;
 67. Landry RG, Jean M. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. *Int Dent J [Internet].* 2002 Feb 1 [cited 2019 Jan 7];52(1):35–40. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1875-595X.2002.tb00595.x>
 68. STOKES, J.R., and DAVIES GA. Viscoelasticity of human whole saliva collected after acid and mechanical stimulation. *Biorheology.* 2007;141–60.
 69. BioRad. Experion™ Automated Electrophoresis System Instruction-Manual. Catalog #700-7000.
 70. Cypriano S, de Sousa MLR, Wada RS. Avaliação de índices CPOD simplificados em levantamentos epidemiológicos de carie dentária. *Rev Saude Publica.* 2005;39(2):285–92.
 71. O jornalDentistry. O Jornal Dentistry [Internet]. SPPI - Dia Europeu da Saúde Periodontal 2019. 2019. p. 1. Available from:
<https://www.jornaldentistry.pt/news/noticias/sppi---dia-europeu-da-saude-periodontal-2019>
 72. Bhuptani D, Kumar S, Vats M, Sagav R. Age and gender related changes of salivary total protein levels for forensic application. 2018;36(1):26–33.
 73. Thiruvanamai Sivakumar, Arthur R. Hand MM. Secretory proteins in the saliva of children. *J Oral Sci.* 2009;51:573–80.
 74. PavitraAjitVibhakar SRP, Monica R Yadav PV. Salivary Total Protein Levels and their Correlation to Dental Caries. *Int J oral Maxillofac Pathol.* 2013;3–6.
 75. Michael W.J Dodds DAJ, Connie C Mobley KMH. Parotid Saliva Protein Profiles in Caries-Free and Caries Active Adults. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 1997;83:51–244.
 76. Katie P. Wu, Jyh-YuhKe C-YC, Chia-ling Chen, Tsong-Long Hwang M, Yen Chou, Alice M.K. Wong C-FH, Lee. Y-C. Relationship between

- unstimulated salivary flow and saliva composition of healthy children in Taiwan. *Chang Gung Med J.* 2008;31(6–28).
77. J Tenovuo, OP Lehtonen, Aaltonen PT. Antimicrobial factors in whole saliva of human infants. *Infect Immun.* 1986;1:49–53.
 78. Mulki Shaila, G. Prakash Pai and PS. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;16.
 79. CW Leone FO. Physical and Chemical Aspects of Saliva as Indicators of Risk for Dental Caries in human. *J Dent Educ.* 2001;65:1054–64.
 80. Gopinath VK, Arzreanne AR. Saliva as a Diagnostic Tool for Assessment of Dental Caries. *Arch Orofac Sci.* 2006;1:57–9.
 81. Teixeira KIR, Bueno AC, Cortés ME. Processos Físico-Químicos no Biofilme Dentário Relacionados à Produção da Cárie. *Rev Científica Química Nov na Esc.* 2010;32(3):145–50.
 82. Galgut P. The relevance of pH to gingivitis and periodontitis. *J Int Acad Periodonto.* 2001;
 83. Hemashree J, Gayathri R, Vishnupriya V. Variations in buffering capacity and total protein concentration of saliva in patients with and without periodontitis. *Drug Invent Today | [Internet].* 2018;10(8):1511–155. Available from: <http://jprsolutions.info/files/final-file-5b556dae562206.19637048.pdf>
 84. L Sewón, E Söderling SK. Comparative study on mineralization-related intraoral parameters in periodontitis-affected and periodontitis-free adults. *PubMed Commons. Scand J Dent Res.* 1990;98(4):12–305.
 85. Pappa E, Kousvelari E, Vastardis H. Saliva in the “Omics” era: A promising tool in paediatrics. *Oral Dis.* 2019;25(1):16–25.
 86. Xu F, Laguna L, Sarkar A. Aging-related changes in quantity and quality of saliva: Where do we stand in our understanding? *J Texture Stud.* 2019;50(1):27–35.
 87. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. 2002;(5):117–29.
 88. Schützemberger E, Souza T, Petruccix E, Machado N, Armando J. Análise bioquímica do fluido salivar de indivíduos portadores de doença periodontal Biochemical analysis of saliva of subjects with periodontal disease. *Rsbo.* 2007;43.
 89. Devi TJ. Saliva – A Potential Diagnostic Tool. *IOSR J Dent Med Sci.* 2014;13(2):52–7.
 90. Holbrook WP de SJ and de GJ. Prediction of dental caries in pre-school children. *Caries Res.* 1993;424–30.
 91. M Vehkalahti , E Nikula-Sarakorpi IP. Evaluation of salivary tests and

- dental status in the prediction of caries increment in caries susceptible teenagers. *Caries Res.* 1996;22–8.
92. Percival RS, Challacombe SJ MP. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res.* 1994;20:73:1416.
 93. Heintze U, Birkhed D BH. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J.* 1983;28:7:227.
 94. Yeh CK, Johnson DA DM. Impact of aging on human salivary gland function: a community-based study. *Aging Clin Exp Res.* 1998;8:10–421.
 95. J S. Age, sex and contralateral differences in the volumes of human submandibular salivary glands. Vol. 7, *Arch Oral Biol.* 1975. 20–885 p.
 96. S Ericson. The importance of sialography for the determination of the parotid flow. Vol. 1, *Acta Otolaryngol.* 1971. 72:437.
 97. Ericson S, Hedin M W. Variability of the submandibular flow rate in man with special reference to the size of the gland. *Odontol Rev.* 1972;20:23:411.
 98. Dawes C, Cross HG, Baker CG CF. The influence of gland size on the flow rate and composition of human parotid saliva. *J Can Dent Assoc.* 1978;5:1:21.
 99. Inoue H, Ono K, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, Yokota M, et al. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Arch Oral Biol.* 2006;51(12):1055–60.
 100. AFFOO, R.H., FOLEY, N., GARRICK, R., SIQUEIRA, W.L., and MARTIN R. Meta-analysis of salivary flow rates in young and older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2015;63:2142–51.
 101. ANDENBERGHE-DESCAMPS, M., LABOURÉ, H., PROT, A., SEPTIER C, TOURNIER, C., FERON, G., and SULMONT-ROSSÉ C. Salivary flow decreases in healthy elderly people independently of dental status and drug intake. *J Texture Stud.* 2016;47:353–60.
 102. SA Pyati, R Naveen Kumar, V Kumar, NH Praveen Kumar KPR. Salivary Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Total Protein, Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Children with and without Dental Caries. *J Clin Pediatr Dent.* 2018;42:445–9.

VI. ANEXOS

Anexo I: Consentimento Informado



Consentimento esclarecido

É convidado(a) a participar voluntariamente neste estudo que tem como parceiro estratégico o SalivaTec da Universidade Católica Portuguesa. A sua participação contribuirá para melhorar o conhecimento da saúde oral da população da região de Viseu e contribuir para o desenvolvimento de estudo de validação da saliva como fluido de diagnóstico.

A informação e as amostras de saliva recolhidas serão utilizadas na investigação dos alunos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, e dos investigadores do laboratório SalivaTec.

A participação neste estudo é totalmente voluntária, não implicará qualquer encargo para si, não será feito nenhum tratamento nem será testado nenhum novo produto ou medicamento, apenas será feita observação e registo de dados e recolha de uma amostra de saliva.

Todos os dados recolhidos são estritamente confidenciais e serão exclusivamente utilizados pelos investigadores de forma anonimizada.

Obrigado pela colaboração.

-----CORTAR POR AQUI-----

Eu, _____ portador
do Cartão de cidadão/ Bilhete de Identidade
_____, fui devidamente informado (a) e
esclarecido (a) e autorizo a utilização da informação, amostra de saliva e exame
clínico, para análise deste trabalho de investigação.

Sei que em qualquer momento posso solicitar a destruição da amostra de saliva e/ou
dados recolhidos.

Para qualquer esclarecimento adicional deve contactar o SalivaTec, Instituto de
Ciências da Saúde-Viseu, Estrada da Circunvalação, 3504-505, Viseu.

Telefone +351232419500 ou salivatec@viseu.ucp.pt

Viseu, _____ (dia) de _____ (mês) de _____ (ano).

Assinatura do dador: _____

Anexo II: Dados Clínicos

Dados Clínicos

Start of Block: 1. Informação geral da amostra

Código SalivaRack



Data de Preenchimento (dd/mm/aaaa)



Material biológico

Saliva não estimulada

Bochecho

Biofilme

Saliva estimulada

Saliva não estimulada (Oasis)

Não recolheu amostra biológica

Nome do Investigador ou Médico Dentista

Género

Feminino

Masculino



Altura (cm)

Sabe _____

Não sabe



Peso (Kg)

Sabe _____

Não sabe



Perímetro Abdominal (cm)

Sabe _____

Não sabe



Etnia

- Caucasiana
 - Africana
 - Oriental
 - Cigana
 - Outra
 - Não respondeu
-

Estado Civil

- Casado
 - Solteiro
 - Divorciado
 - Viúvo
-



Nível de Escolaridade

- Básico (até ao 9º ano)
- Médio (até ao 12º ano)
- Licenciatura, Mestrado e/ou Doutoramento
- Outra
- Não respondeu

End of Block: 2. Informação geral acerca do dador

Start of Block: Introdução - Hábitos Tabágicos

O grupo de questões que se segue pretende avaliar os seus hábitos tabágicos.

End of Block: Introdução - Hábitos Tabágicos

Start of Block: 3. Hábitos Tabágicos



Fuma ou já fumou?

- Sim
- Não
- Ex-fumador



Se fuma/fumou:

- Com que idade começou a fumar?

- Não sabe



Quantos cigarros fuma/fumava:

- Até 10
- Mais do que 10
- Não sabe



Se é ex-fumador há quantos anos deixou de fumar?

- Sabe _____
- Não sabe

End of Block: 3. Hábitos Tabágicos

Start of Block: Introdução - Consumo de Álcool

O grupo de questões que se segue pretende avaliar o seu consumo de álcool.

End of Block: Introdução - Consumo de Álcool

Start of Block: 4. Consumo de Álcool



Bebe ou já bebeu, regularmente, bebidas alcoólicas?

- Sim
- Não



Se bebe/bebeu, com que idade começou?

- Idade _____
- Não sabe



Número de copos de vinho (por semana):

- Até 14
- Mais de 14
- Não sabe
- Não bebe



Número de cervejas (por semana):

- Até 14
 - Mais de 14
 - Não sabe
 - Não bebe
-



Número de digestivos/bebidas brancas (por semana):

- Até 7
 - Mais de 7
 - Não sabe
 - Não bebe
-



Deixou de beber? Se sim, com que idade?

- Sim _____
- Não

End of Block: 4. Consumo de Álcool

Start of Block: 5. Alterações hormonais

O grupo de questões que se segue pretende avaliar possíveis alterações hormonais.



Está grávida?

Sim

Não

Se sim, de quantos meses?



Encontra-se na menopausa?

Sim

Não

Se sim, há quanto tempo (anos)?

Há quanto tempo teve a última menstruação (dias)?



Toma anticoncepcionais?

Sim

Não

Se sim, qual?

End of Block: 5. Alterações hormonais

Start of Block: Introdução - Saúde

O grupo de questões que se segue destina-se a recolher informação geral acerca da sua saúde

End of Block: Introdução - Saúde

Start of Block: 6. Saúde

X→

Grupo Sanguíneo (sistema ABO)

- A
- B
- AB
- O
- Não sabe

X→

Grupo sanguíneo (fator Rh)

- Rh+
- Rh-
- Não sabe

X→

Tem hipertensão?

- Sim
- Não
- Não sabe



Problemas cardíacos:

- Angina
- Arritmias
- Insuficiência cardíaca
- Ataque cardíaco
- Outra
- Outra (não sabe)
- Não tem

Outros problemas cardíacos:



Tem Diabetes?

- Tipo 1
 - Tipo 2
 - Não sabe (qual o tipo)
 - Não sabe (se tem)
 - Não tem
-



Tem alguma doença de sangue?

- Anemia
 - Hemofilia
 - Outra
 - Outra (não sabe)
 - Não tem
-

Outras doenças de sangue:



Doenças de fígado:

- Fígado gordo
 - Hepatite B
 - Outra
 - Outra (não sabe)
 - Não tem
-

Outras doenças de fígado:



Doenças de estômago:

- Gastrite
 - Úlcera péptica
 - Refluxo
 - Outra
 - Outra (não sabe)
 - Não tem
-

Outras doenças de estômago:



Doenças renais:

- Pedras no rim
 - Quisto
 - Outra
 - Outra (não sabe)
 - Não tem
-

Outras doenças renais:



Outras doenças:

- Epilepsia
 - Asma
 - Urticária
 - Sinusite
 - Acne
 - Outra
 - Não tem
-

Outras doenças:



Tem alergias?

- Medicamentos
- Dispositivos médicos
- Alimentos
- Picadas de insectos
- Ácaros
- Pólen
- Outra
- Outra (não sabe)
- Não tem

Outras alergias:



Não responda a este item.

Score da saúde _____



Foi sujeito a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?

Sim

Não

Se sim, há quanto tempo? (anos)



História Familiar - Existem doenças na família como?

Doenças Cardíacas

Diabetes

Cancro

Outra

Outra (não sabe)

Não tem

Não sabe

Outras:

End of Block: 6. Saúde

Start of Block: Introdução - Medicação

O grupo de questões que se segue pretende recolher informações relevantes relativas à sua medicação.

Start of Block: 7. Medicação

Faz algum tipo de tratamento médico ou medicação com regularidade?

- Sim
 - Não
 - Não sabe
-

Se sim, refira-o:



Fez algum tipo de tratamento médico ou medicação nos últimos 30 dias?

- Sim
 - Não
-



Se sim, refira-o:

- Procedimento cirúrgico
- Bifosfanatos
- Corticoesteróides
- Outra

Outra:



Tomou algum antibiótico nos últimos 3 meses?

- Sim
- Não

Se sim, refira-o:

Recebeu recentemente a vacina da gripe? (últimos 6 meses)

- Sim
 - Não
 - Não sabe
-

Nos últimos 12 meses foi consultado por um médico?

- Sim
 - Não
-

X→

Se sim, em que especialidade(s)?

- Médico de consulta geral e familiar
- Especialidade

End of Block: 7. Medicação

Start of Block: 8. Alimentação

O grupo de questões que se segue pretende avaliar o seu tipo de alimentação.

X→

Utiliza azeite como principal gordura culinária?

- Sim
 - Não
-

X→

Usa mais de 4 colheres de sopa de azeite por dia? Considere fritar, temperar saladas, refeições fora de casa, etc).

Sim

Não

X→

Come mais de 200g (1 porção) de hortícolas por dia?

Sim

Não

X→

Come mais de 3 peças de fruta por dia (considere um sumo natural como uma peça de fruta.

Sim

Não

X→

Come menos que uma porção de carne vermelha por dia? Considerar 100-150g de carne ou produtos como presunto, salsicha, fiambre, etc.

Sim

Não

X→

Come menos que 1 colher de sopa de manteiga, margarina ou natas por dia?

Sim

Não

X→

Bebe menos que 1 bebida açucarada ou gaseificada por dia?

Sim

Não

X→

Bebe mais que 7 copos de vinho por semana?

Sim

Não

X→

Come leguminosas (favas, lentilhas, feijão ervilha, etc) mais que 3 porções por semana?

Sim

Não

X→

Comer peixe ou marisco (1 dose são 100-150 gramas de peixe ou seja 4-5 unidades ou 200g de marisco) **mais** que 3 porções por **semana**?

Sim

Não



Comer bolos ou outros produtos de pastelaria (biscoitos, bolachas, etc) **menos** de 3 vezes por **semana**?

Sim

Não



Comer oleaginosas **mais** de 3 vezes (nozes, amendoas, amendoins) por **semana**?

Sim

Não



Comer **preferencialmente** frango, peru ou coelho em vez de vaca, porco ou salsichas?

Sim

Não



Come hortícolas, massa, arroz ou outros pratos com refogados (molho de tomate, cebola, alho francês ou alho e azeite) **mais** que duas vezes por **semana**?

Sim

Não



Não responda a este item.

Score do tipo de dieta

End of Block: 8. Alimentação

Start of Block: 9. GOHAI

O grupo de questões que se segue pretende avaliar o seu nível de auto percepção relativamente à sua saúde oral.



Nos últimos 3 meses diminuiu a quantidade de alimentos ou mudou o tipo de alimentação por causa dos seus dentes?

Sempre

Algumas vezes

Nunca

Nos últimos 3 meses teve problemas para mastigar alimentos?

Sempre

Algumas vezes

Nunca

Nos últimos 3 meses teve dor ou desconforto para engolir alimentos?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses mudou o seu modo de falar por causa dos problemas da sua boca?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses sentiu algum desconforto ao comer algum alimento?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses deixou de se encontrar com outras pessoas por causa da sua boca?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses sentiu-se satisfeito ou feliz com a aparência da sua boca?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses teve que tomar medicamentos para passar a dor ou o desconforto da sua boca?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses teve algum problema na sua boca que o deixou preocupado?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses chegou a sentir-se nervoso por causa dos problemas na sua boca?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses evitou comer junto de outras pessoas por causa de problemas na boca?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-

Nos últimos 3 meses sentiu os seus dentes ou gengivas ficarem sensíveis a alimentos ou líquidos?

- Sempre
 - Algumas vezes
 - Nunca
-



Não responda a este item.

- Score de autoperceção
-

Qual a auto-perceção que tem da sua saúde oral?

- Excelente
- Muito boa
- Boa
- Razoável
- Pobre

End of Block: 9. GOHAI

Start of Block: 10. Oral Health Impact Profile (OHIP-14)

Nos últimos meses, por causa de problemas com os seus dentes, a sua boca ou a sua dentadura:

	Nunca (0)	Raramente (1)	Às vezes (2)	Repetidamente (3)	Sempre (4)
Teve problemas para falar alguma palavra?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sentiu que o sabor dos alimentos tem piorado?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sentiu dores na sua boca ou nos seus dentes?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sentiu-se incomodado(a) ao comer algum alimento?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ficou preocupado(a)?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sentiu-se nervoso(a)?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
A sua alimentação ficou prejudicada?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Teve que parar as suas refeições?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Teve dificuldade em descansar?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ficou com vergonha?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ficou aborrecido(a) com as pessoas?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Teve dificuldade em fazer as suas tarefas diárias?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sentiu que a sua vida piorou?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Não conseguiu
fazer as suas
tarefas diárias?



End of Block: 10. Oral Health Impact Profile (OHIP-14)

Start of Block: 11. Hábitos e comportamentos de higiene oral

O grupo de questões que se segue pretende avaliar os seus hábitos e comportamentos de higiene oral.

Costuma escovar os dentes diariamente?

Sim

Não

Se sim, quantas vezes por dia?

<span style="font-size:11.0pt;line-height:107%; font-family:"Calibri",sans-serif;mso-ascii-theme-font:minor-latin;mso-fareast-font-family: Calibri;mso-fareast-theme-font:minor-latin;mso-hansi-theme-font:minor-latin; mso-bidi-font-family:"Times New

Roman";mso-bidi-theme-font:minor-bidi; mso-ansi-language:PT;mso-fareast-language:EN-US;mso-bidi-language:AR-SA">Costuma utilizar fio dentário?

- Não
 - Sim, às vezes
 - Sim, diariamente
 - Não sei o que é o fio dentário.
-

Quando foi a última vez que visitou um dentista?

- Durante o ano passado
 - Há 2 anos
 - Há 5 anos
 - Há mais de 5 anos
 - Nunca
-

Sente alguma dor na região da face ou no interior da boca?

- Sim
 - Não
-

<span style="font-size:11.0pt;line-height:107%; font-family:"Calibri",sans-serif;mso-ascii-theme-font:minor-latin;mso-fareast-font-family: Calibri;mso-fareast-theme-font:minor-latin;mso-hansi-theme-font:minor-latin; mso-bidi-font-family:"Times New Roman";mso-bidi-theme-font:minor-bidi; mso-ansi-language:PT;mso-fareast-

language:EN-US;mso-bidi-language:AR-SA">Sente que a sua boca esta "seca"?

Sim

Não

Se sim, tenta compensar este facto com maior consumo de água?

Sim

Não

Sente alguma alteração no paladar?

Sim

Não

Usa prótese(s) dentária

Sim

Não

End of Block: 11. Hábitos e comportamentos de higiene oral

Anexo III: Dados Avaliação Oral

Avaliação Oral

Start of Block: 11. Reabilitação protética

Q155 As próximas questões que se seguem relacionam-se com o uso de prótese. Estas deverão ser respondidas com a ajuda de um médico dentista.

Q186 Utiliza prótese?

Sim

Não

12.2 Que prótese utiliza?

Superior

Inferior

Ambas

Q187 Click to write the question text

Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV
_____ Superior	_____ Superior	_____ Superior	_____ Superior
_____ Inferior	_____ Inferior	_____ Inferior	_____ Inferior

12.3 A que tipo de classificação de Kennedy corresponde a prótese que utiliza?

- Classe I
- Classe II
- Classe III
- Classe IV

12.4 Que tipo de prótese utiliza?

- Total
- Parcial acrílica
- Parcial esquelética
- Fixa

12.5 Quando utiliza prótese?

- Sempre
 - Às vezes
 - Só durante as refeições
 - Nunca
-

Q157 Como faz a higienização da sua prótese?

- Só com água
 - Com água e escova
 - Pastilhas de limpeza
 - Produto dentário (qual?) _____
-

Q158 Quantas vezes por dia é feita essa higienização?

12.6 Costuma retirar a prótese para dormir?

- Sempre
 - Às vezes
 - Raramente
 - Nunca
-

12.7 Há quanto tempo utiliza uma prótese dentária? (anos)

0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

Click to write Choice 1	
-------------------------	--

12.8 Há quanto tempo tem a atual prótese dentária? (anos)

0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

Click to write Choice 1



12.9 Qual a frequência de consultas de manutenção protética?

- 3 em 3 meses
- 6 em 6 meses
- 1 vez por ano
- Nenhuma das hipóteses

End of Block: 11. Reabilitação protética

Start of Block: Block 2

Q185 Código SalivaRack

End of Block: Block 2

Start of Block: 12. Observação clínica

Q250 O grupo de questões que se segue pretende avaliar a sua saúde oral. Informação a preencher pelo médico dentista.

Page Break



	Saudável	Lesão por cárie	Cavidades preenchidas com cárie	Cavidades preenchidas sem cárie	Dente perdido por cárie	Dente perdido (outra razão)	Selante	Prótese ou implante	Não erupcionado	T
18	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
17	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
16	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
15	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
14	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
13	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
12	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
11	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
21	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
22	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
23	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
24	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
25	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
26	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
27	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	



Page Break

Q252 Índice CPOD - Arcada inferior

	Saudável	Lesão por cárie	Cavidades preenchidas com cárie	Cavidades preenchidas sem cárie	Dente perdido por cárie	Dente perdido (outra razão)	Selante	Prótese ou implante	Não erupcionado	Trauma	Não registrado
48	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
47	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
46	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
45	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
44	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
43	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
42	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
41	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
31	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
32	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
33	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
34	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
35	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
36	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
37	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

○ (○ ○ C C C C ○ C ○

Page Break _____



Q253 Índice de Higiene Oral (Total %)

- 0
- 25
- 50
- 75
- 100



Page Break

Q254 Periodontal Screening Record (PSR)

	1º Sextante	2º Sextante	3º Sextante	4º Sextante	5º Sextante	6º Sextante
Saúde Periodontal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sangrento à sondagem (BOP)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cálculo detectado durante a sondagem, margem iatrogénica e BOP	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolsa Periodontal 3,5-5,5mm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolsa Periodontal 6mm ou superior	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anomalias periodontais (envolvimento da furca, mobilidade dentária, recessão gengival, problemas muco-gengivais)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Q181 Índice de sangramento (BOP)

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100



Page Break

Q255 Diagnóstico Oral

- Saudável
- Gengivite _____
- Mucosite _____
- Periodontite Inicial _____
- Periodontite Moderada _____
- Periodontite Severa com possível perda adicional de dentes _____
- Periodontite Severa com possível perda da dentição _____
- Peri-implatite _____
- Mucosite Peri-implantar _____
- Deficiências nos tecidos peri-impantares _____
- Estomatite protética - Classe I _____
- Estomatite protética - Classe II _____
- Estomatite protética - Classe III _____
- Estomatite protética (classe não determinada) _____
- Outra _____

Page Break



Q256 Necessidade de tratamento médico-dentário?

Sim

Não



Q257 Necessidade de reabilitação protética?

Sim

Não

End of Block: 12. Observação clínica

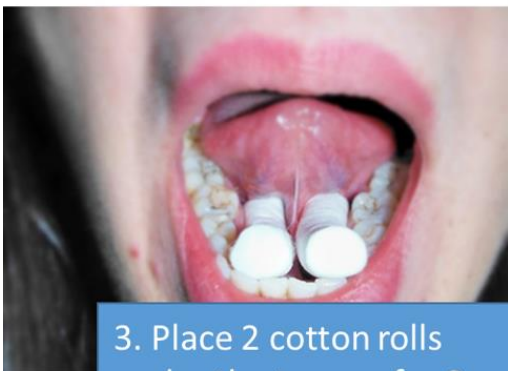
Anexo IV: Protocolo de recolha de saliva



1. Rinse mouth with water for 30 s.



2. Wait for 1 minute.



3. Place 2 cotton rolls under the tongue for 2 minutes.



4. Remove the cotton rolls with sterile gloves or forceps.



5. Place the rolls on a 15mL sterile tube.



6. Store at -80°C .

Anexo V- BCA Protein Assay Kit

INSTRUCTIONS

Pierce Biotechnology PO Box 117 (815) 968-0747 www.thermoscientific.com/pierce 3747 N. Meridian Road
Rockford, IL 61105 USA (815) 968-7316 fax

Number Description

Pierce™ BCA Protein Assay Kit

23225 23227

1296.9

23225 Pierce BCA Protein Assay Kit, sufficient reagents for 500 test-tube or 5000 microplate assays

23227 Pierce BCA Protein Assay Kit, sufficient reagents for 250 test-tube or 2500 microplate assays

Kit Contents:

BCA Reagent A, 1000mL (in Product No. 23225) or 500mL (in Product No. 23227), containing sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartrate in 0.1M sodium hydroxide

BCA Reagent B, 25mL, containing 4% cupric sulfate

Albumin Standard Ampules, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules, containing bovine serum albumin (BSA) at 2mg/mL in 0.9% saline and 0.05% sodium azide

Storage: Upon receipt store at room temperature. Product shipped at ambient temperature.

Note: If either Reagent A or Reagent B precipitates upon shipping in cold weather or during long-term storage, dissolve precipitates by gently warming and stirring solution. Discard any kit reagent that shows discoloration or evidence of microbial contamination.

Table of Contents

Introduction

.....1

Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures).....2

Test Tube Procedure (Sample to WR ratio = 1:20)

.....3

Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)

.....3

Troubleshooting.....4

Related Thermo Scientific Products

.....5

Additional Information

.....5

References

.....6

Introduction

The Thermo Scientific™Pierce™BCA Protein Assay is a detergent-compatible formulation based on bicinchoninic acid (BCA) for the colorimetric detection and quantitation of total protein. This method combines the well-known reduction of Cu^{+2} to Cu^{+1} by protein in an alkaline medium (the biuret reaction) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{+1}) using a unique reagent containing bicinchoninic acid.¹ The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562nm that is nearly linear with increasing protein concentrations over a broad working range (20-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The BCA method is not a true end-point method; that is, the final color continues to develop. However, following incubation, the rate of continued color development is sufficiently slow to allow large numbers of samples to be assayed together.

The macromolecular structure of protein, the number of peptide bonds and the presence of four particular amino acids (cysteine, cystine, tryptophan and tyrosine) are reported to be responsible for color formation with BCA.² Studies with di-, tri- and tetrapeptides suggest that the extent of color formation caused by more than the mere sum of individual color-producing functional groups.² Accordingly, protein concentrations generally are determined and reported with reference to standards of a common protein

such as bovine serum albumin (BSA). A series of dilutions of known concentration are prepared from the protein and assayed alongside the unknown(s) before the concentration of each unknown is determined based on the standard curve. If precise quantitation of an unknown protein is required, it is advisable to select a protein Pierce Biotechnology PO Box 117 (815) 968-0747 www.thermoscientific.com/pierce 3747 N. Meridian Road Rockford, IL 61105 USA (815) 968-7316 fax 2

standard that is similar in quality to the unknown; for example, a bovine gamma globulin (BGG) standard (see Related Thermo Scientific Products) may be used when assaying immunoglobulin samples. Two assay procedures are presented. Of these, the Test Tube Procedure requires a larger volume (0.1mL) of protein sample; however, because it uses a sample to working reagent ratio of 1:20 (v/v), the effect of interfering substances is minimized. The Microplate Procedure affords the sample handling ease of a microplate and requires a smaller volume (10-25µL) of protein sample; however, because the sample to working reagent ratio is 1:8 (v/v), it offers less flexibility in overcoming interfering substance concentrations and obtaining low levels of detection.

Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures)

A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Use Table 1 as a guide to prepare a set of protein standards. Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the sample(s). Each 1mL ampule of 2mg/mL Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in Table 1. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard. **Table 1.** Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20-2,000µg/mL)

Vial	Volume of Diluent (µL)	Volume and Source of BSA (µL)	Final BSA Concentration (µg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank

Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5-250µg/mL)

Vial	Volume of Diluent (µL)	Volume and Source of BSA (µL)	Final BSA Concentration (µg/mL)
A	700	100 of Stock	250
B	400	400 of vial A dilution	125
C	450	300 of vial B dilution	50
D	400	400 of vial C dilution	25
E	400	100 of vial D dilution	5
F	400	0	0 = Blank


Anexo VI- SalivaPrint- Experion Pro260

SALIVAPRINT- EXPERION PRO260

Protocolo

Equipamento:

- Agitador (Vortex);
- Centrifuga;
- NanoVeú;
- Experion Pro260. **Material:**
- Microtubos PCR – Volume 200 µL;
- Microtubos (Tipo EPPENDORF) - Volume 2,0ml;
- Experion Pro260 chips;
- Pipetas e pontas (de 2, 20, 100 e 1000 µL). **Reagentes:**
- Água MiliQ;
- Solução Stain Pro260;
- Ladder Pro260;
- Buffer de amostra Pro260; ○ Gel Pro260; ○ β-Mercaptoethanol.

Identificação da substância	Comercializado por	Símbolos de perigo	Advertências de perigo	Localização
β-Mercaptoethanol	Bio-Rad		<ul style="list-style-type: none"> ○ L líquido combustível; ○ T tóxico por ingestão ou inalação; ○ M mortal em contacto com a pele; ○ P provoca irritação cutânea; ○ P provoca lesões oculares graves; ○ P pode provocar uma reação alérgica cutânea; ○ P pode afetar o fígado e o coração após exposição prolongada ou repetida. Forma de exposição: por ingestão. tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Laboratório de Bioquímica

Material de segurança:

- Luvas nitrilo;
- Bata de laboratório.

Procedimento

TAREFAS INICIAIS:

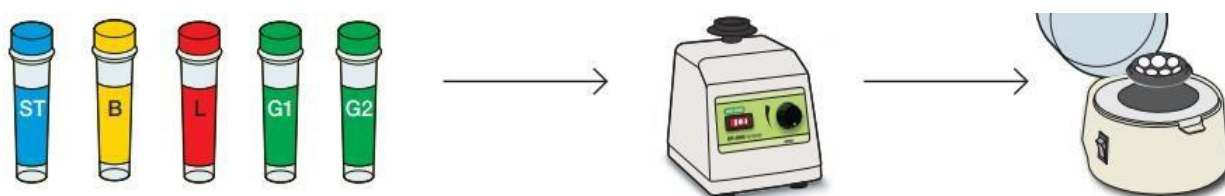
Desinfetar a bancada de trabalho e as pipetas.
Equilibrar os reagentes à temperatura ambiente por ~15-20 min protegidos da luz.

Ligar o bloco de aquecimento ou banho-maria seco a 95-100 °C, que será usado futuramente para desnaturar as amostras e o Ladder Pro260.
Fazer uma limpeza dos elétrodos.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES:

Após equilibrados à temperatura ambiente, protegidos da luz, levar brevemente os tubos dos reagentes ao Vortex e de seguida à microcentrífuga para as soluções irem para o fundo dos tubos.
Certificar-se de que a solução Stain Pro260 (tampa azul) está descongelada.

- *Stain Pro260 (tampa azul)*
- *Buffer de amostra Pro260 (tampa amarela)*
- *Ladder*
- *Pro260 (tampa vermelha)*
- *2 tubos de gel Pro260 (tampa verde)*



NOTA: Tanto a solução do Gel(G) e a do Gel-Stain(GS), podem ser preparadas previamente e podem ser usadas durante 1 mês, conservados a 4°C protegidos da luz. Após 1 mês, devem ser novamente filtradas para serem novamente usadas.

Preparação do Gel (G) e do Gel-Stain (GS):

Gel-Stain (GS):

Adicionar 20 µl de Stain Pro260 (tampa azul) ao tubo de Gel Pro260 (tampa verde; 520µl).

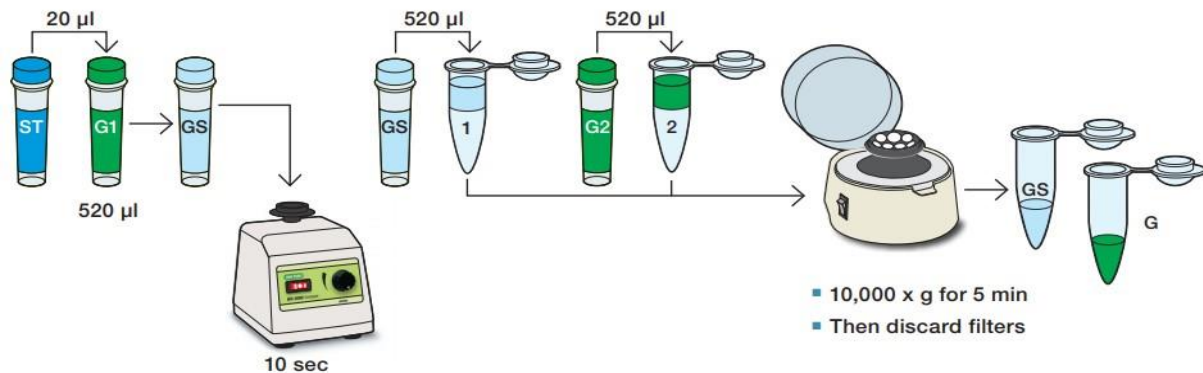
Levar ao Vortex por 10 segundos na configuração mais alta e de seguida levar brevemente à microcentrífuga.

Preparação final dos Géis:

Transferir o Gel-Stain e o conteúdo do outro Gel (G2) para um spin filter, etiquetar e datar os tubos.

Centrifugar ambos spin filters por 5 minutos a 1000xg.

Verificar se todo o gel passou pelos filtros e descartar os filtros.
Deve-se cobrir o Gelstain com papel alumínio.



Preparação do Buffer das amostras:

(Para cada chip)

As amostras de proteínas podem ser separadas nas condições redutoras ou não redutoras, os dois tipos de amostras podem ser executadas no mesmo chip.

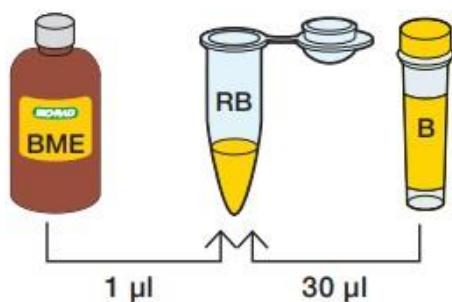
Condições redutoras:

Juntar, num tubo de microcentrífuga, 1 µl de Beta-mercaptoetanol com 30 µl de Sample Buffer (tampa amarela).
Levar brevemente ao vortex e de seguida à microcentrífuga.

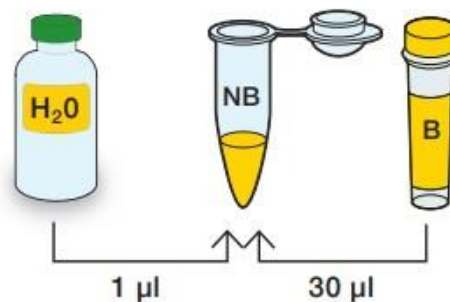
Condições não redutoras:

Transferir 30 µl de Sample Buffer (tampa amarela) para 2 tubos de microcentrífuga.
Adicionar 1 µl de beta-mercaptoetanol a um dos tubos (reducing sample buffer) e no outro tubo adicionar 1 µl de água desionizada (nonreducing sample buffer).
Levar brevemente os tubos ao vortex e cobri-los com papel alumínio para os proteger da luz.

Reducing Conditions



Nonreducing Conditions



NOTA:

- Necessário preparar os Sample Buffer diariamente, de fresco.
- Nas condições não redutoras utiliza-se dois estoques de Sample Buffer pois o Ladder Pro260 necessita de condições redutoras para a sua separação.

Preparação das amostras e do Ladder Pro260:

Preparação do Ladder:

Juntar 4 µl de Ladder Pro260 (tampa vermelha) com 2 µl de Sample Buffer com betamercaptoetanol (reducing sample buffer) num tubo de microcentrifuga. **Preparação das amostras:**

Juntar 4 µl de amostra e 2 µl de Sample Buffer (na forma reduzida ou não reduzida) num tubo de microcentrifuga.

Nota: Não esquecer de juntar o buffer as amostras e ao Ladder antes de colocar 10min no banho de aquecimento

Após isso:

Levar, por alguns segundos, todos os tubos ao vortex e a microcentrifuga.

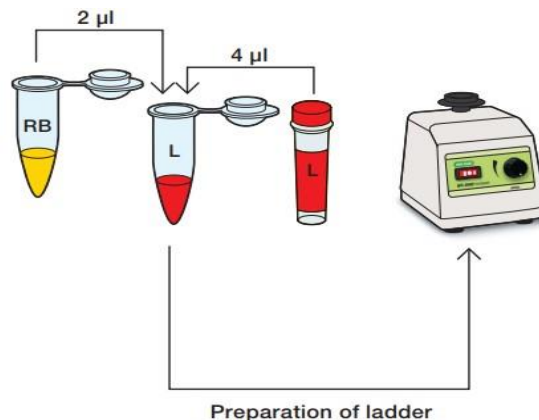
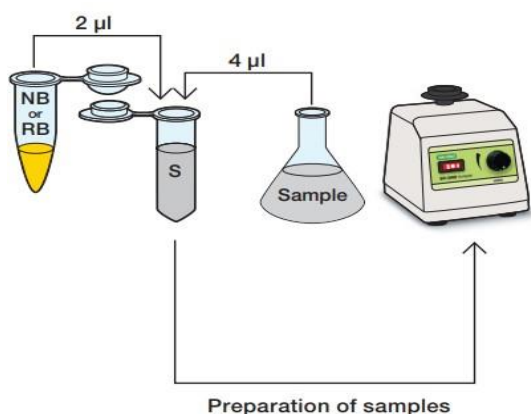
Aquecer as amostras e o Ladder Pro260 a 95-100°C durante 10 minutos.

Após o aquecimento, colocar na microcentrifuga por alguns segundos.

Adicionar 84 µl de água desionizada a cada tubo e agitar brevemente no vortex para misturar. **Não alterar as concentrações das amostras neste passo.**

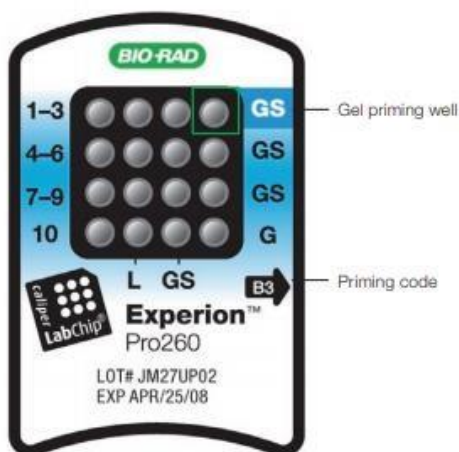
NOTA:

- Ambas as amostras diluídas e o ladder Pro260 são estáveis durante várias horas quando armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz.



Preparação do CHIP:

Pipetar 12 µl de Gel-Stain (GS) para o poço superior direito do Chip (poço de injeção).



DICA: Insira a ponta da pipeta verticalmente e no fundo do poço ao dispensar. Dispensar lentamente até a primeira parada da pipeta e não expelir o ar no final da etapa de pipetagem.

Na Priming Station, defina a configuração de pressão para B e a configuração de tempo para 3, conforme indicado no Chip.

Abra a tampa da Priming Station e coloque o chip na plataforma, combinando a seta no chip com a seta de alinhamento na plataforma (impede a inserção na posição errada). Não force o chip na posição.

Fechar a tampa da Priming Station pressionando a tampa para baixo. **A tampa deve ficar fechada.**

Pressione **Iniciar** e uma mensagem “Priming” deve aparecer na tela da Priming Station. O timer faz uma contagem regressiva. **Priming requer aproximadamente 60 seg. Não abra a Priming Station durante a contagem regressiva.**

Um sinal sonoro e uma mensagem “Pronto” indicam que o priming está completo. Abra a estação de preparação e remova o chip.

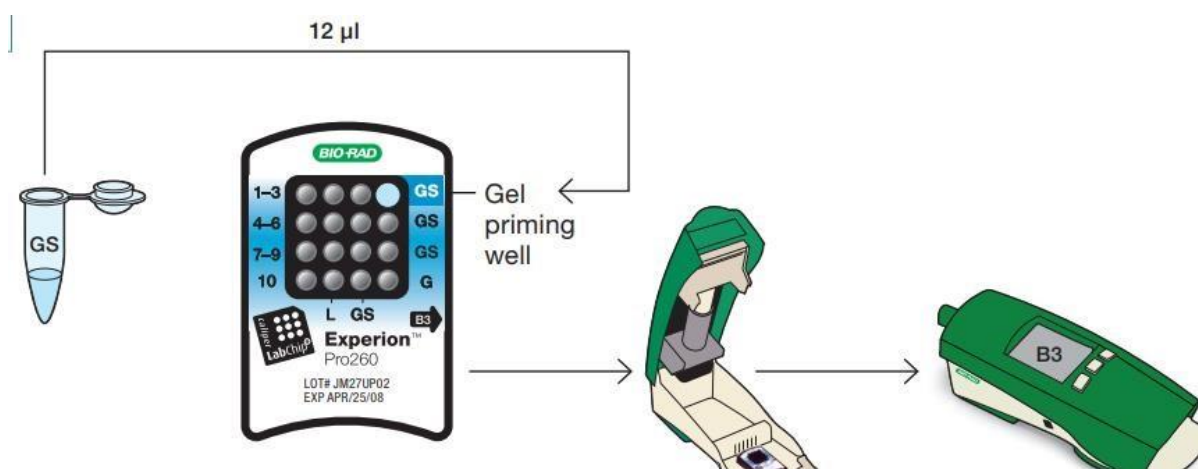
Se a tampa ficar colada, pressione-a enquanto pressiona a alavanca de liberação.

Inspecionar o chip em busca de bolhas ou evidências de priming incompleto.

Colocar o chip numa superfície limpa para completar o carregamento.

NOTA:

- A corrida deve ser iniciada após 5 min de preparação e carregando o chip.
- Se o priming for feito corretamente, os microcanais serão difíceis de ver (pode ser útil comparar um chip preparado com um novo chip não utilizado).
- Se for detetado algum problema, como uma bolha ou priming incompleto, deve-se preparar um novo chip.
- Bolhas forçadas dentro dos microcanais durante o priming assumem a forma do microcanal e são alongadas, não redondas.



Carregamento do CHIP:

Deve-se, usando uma pipeta, remover e descartar qualquer Gel-Stain remanescente no poço GS.

Pipetar 12 µl de Gel-Stain nos 4 poços indicados com GS (incluindo o poço de iniciação do gel).

Pipetar 12 µl de Gel no poço indicado com G.

Pipetar 6 µl de Ladder Pro260 diluído no poço indicado com o L.

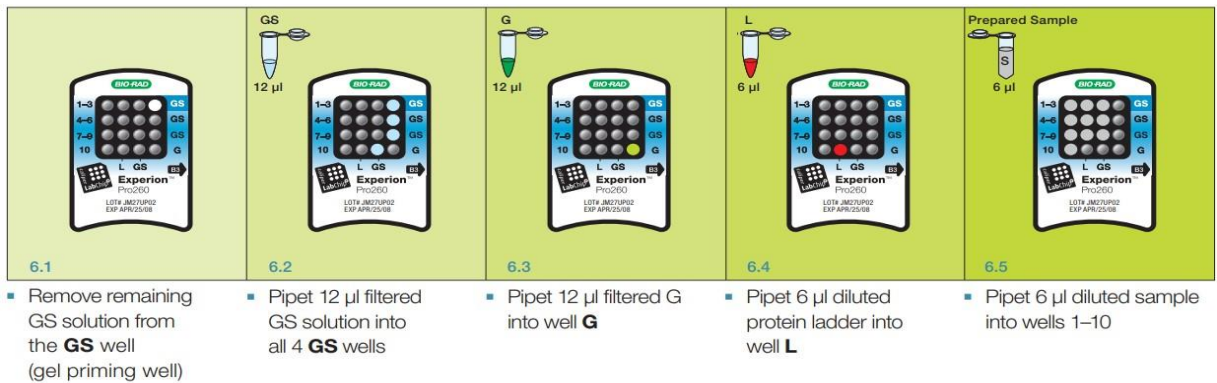
Inspeccionar todos os poços para ver se existem bolhas.

NOTA: Retirar quaisquer bolhas no fundo do poço com uma pipeta limpa ou removendo e recarregando a solução.

Colocar o Chip carregado na estação de eletroforese do Experion e devemos começar a corrida dentro de 5 minutos.

NOTA:

- Todos os poços de um chip devem ser preenchidos para que a estação de eletroforese funcione corretamente.
- O Ladder Pro260 deve ser usado dentro de 8h após a sua preparação.
- O Ladder deve ser carregado no CHIP no local correto, indicado com L.



Execução da análise:

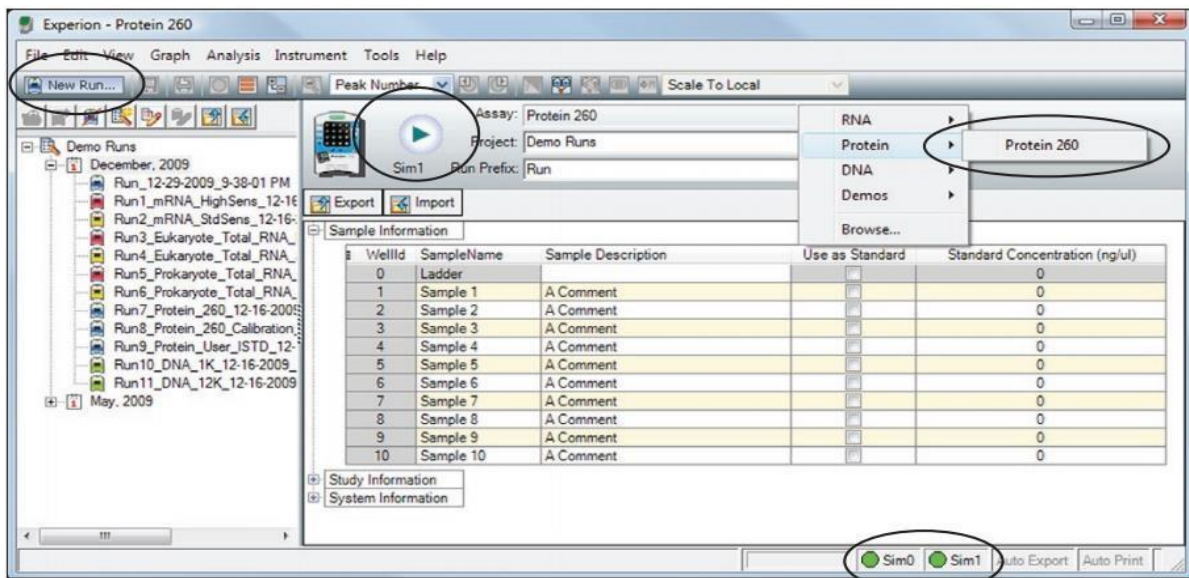
Abrir a tampa da estação de eletroforese e colocar o Chip preparado e carregado na plataforma, fechar a tampa.

Ir à barra de ferramentas, do Software Experion, clicar em NEW RUN e ir em ASSAY selecionar PROTEIN e selecionar PROTEIN 260.

No local PROJECT podemos selecionar FILE depois PROJECT e selecionar NEW.

Para introduzir o nome da corrida no campo RUN PREFIX.

Após tudo completado, clicar em START RUN.



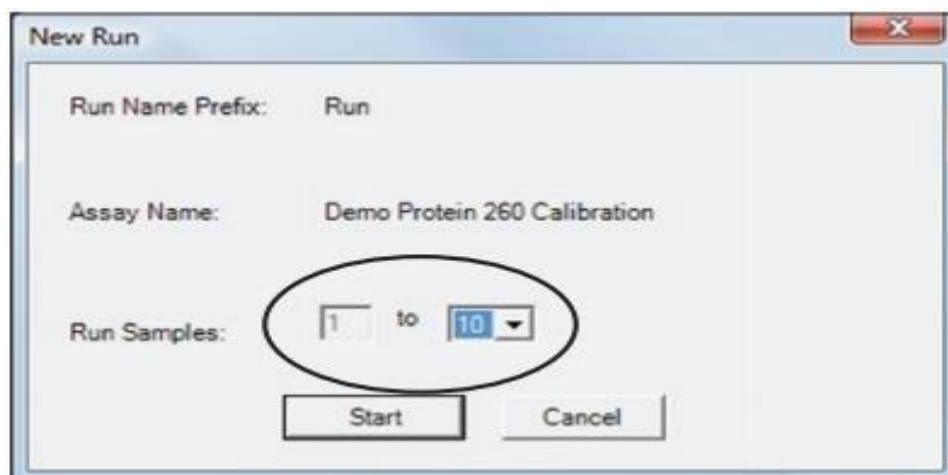
Após clicarmos em START RUN, vai aparecer uma caixa NEW RUN onde teremos de selecionar o número de amostras a serem analisadas.

Embora nenhum poço possa ficar vazio, o sistema Experion interrompe a análise após atingir o número de amostras inseridas.

Clicar em START.

O LED verde no centro do painel frontal da estação de eletroforese pisca e o sistema realiza várias verificações: confirma que um chip foi inserido, que todos os poços contêm líquido, que são feitas conexões elétricas, etc. O contador marca o progresso dessas calibrações no canto superior direito da tela.

Quando a análise estiver completa (após ~ 30 min), o instrumento emite um bipe e uma janela se abre indicando o final da corrida. Selecione OK e remova o chip da plataforma de chip. Limpar os elétrodos usando água desionizada a cada 30 min de cada ciclo de chip Pro260.



NOTA:

- Não abrir a tampa da estação de eletroforese Experion até que a corrida esteja concluída pois abrir a tampa interrompe a corrida.
- Caso apareça a mensagem “**IV Check Error**” indica que o sistema não pode fazer contato elétrico em um dos poços. Isso geralmente significa que há uma bolha no fundo do poço. Aborte a corrida e verifique se há bolhas ou poços vazios no chip. Reabasteça o (s) poço (s) afetado (s) e inicie a corrida novamente.

Limpeza dos elétrodos:

Encher um chip de limpeza com 800 µl de água desionizada (filtro de 0,2 µm).

Bater levemente de lado no chip de limpeza para remover as bolhas presas nos poços.

Colocar o chip de limpeza na plataforma da estação de eletroforese, fechar a tampa e deixar fechada por 1 min.

Abriu a tampa, remover o chip de limpeza e deixar os elétrodos secarem por 1 min. Fechar a tampa.

Substituir a água no chip de limpeza após o uso para evitar contaminação. Para armazenamento, retirar a água do chip de limpeza e guardar o chip em um local limpo.

NOTA:

- Guardar o chip de limpeza vazio e coberto para evitar a entrada de sujidade nos poros.

PROBLEMAS PODEM SURGIR DEVIDO:

- Um ou mais poços não estar corretamente cheio e os elétrodos não ficam submersos.
- Bolhas de ar podem estar a interferir com o contacto elétrico em um ou mais poços.
- Um elétrodo está solto ou desconectado.
- O chip não está colocado corretamente na plataforma.
- Priming incorreto devido, por exemplo, a presenças de bolhas de ar ou um problema do GelStain usado.
- Incorreta preparação das amostras.
- Partículas podem estar a obstruir os canais.
- Dificuldades na migração.
- Volume das amostras não ser o suficiente para a análise.
- Incorreta preparação dos reagentes.
- Não ter respeitado o intervalo de tempo recomendado em determinadas etapas.
- Ter utilizado reagentes, amostras ou chips fora da validade ou que não estivessem em perfeitas condições.
- Terem ocorrido contaminações durante alguma das etapas como a preparação das amostras, reagentes ou do carregamento do chip.
- O pH e ou a concentração das amostras não estarem dentro dos parâmetros recomendados.
- Incorreta limpeza dos elétrodos.