



CATÓLICA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

---

LISBOA · PORTO · VISEU

EFEITO DOS CONTRACETIVOS ORAIS COMBINADOS NA SAÚDE ORAL  
FEMININA: ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA  
DIAGNÓSTICO PRECOCE

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

Por:  
Rita Silva Bornes

Viseu, 2018





# CATÓLICA

## INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

---

LISBOA · PORTO · VISEU

### EFEITO DOS CONTRACETIVOS ORAIS COMBINADOS NA SAÚDE ORAL FEMININA: ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE

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

Por:

Rita Silva Bornes

Orientador: Professora Doutora Marlene Barros

Coorientador: Professor Doutor Santos Paulo

Viseu, 2018



Aos meus pais e à avó Kika



*“Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui, um pouco das saudades que deixei e sou muito das coisas de que gostei.”*

Antoine de Saint-Exupéry



## Agradecimentos

À Professora Doutora Marlene Barros, orientadora deste projeto, pelos ensinamentos, simpatia e compreensão ao longo desta investigação.

Ao Doutor Santos Paulo, coorientador deste projeto, pelo contributo e transmissão de novos conhecimentos.

À Professora Doutora Maria José Correia e ao Professor Doutor Nuno Rosa pelo apoio e auxílio prestados sempre que precisei.

À Mónica, ao Eduardo, à Mariana e ao Igor que foram incansáveis durante a execução deste projeto. Grata pela vossa amabilidade, disponibilidade e amizade.

Aos meus pais, pelo que fizeram para chegar até aqui e pelo amor incondicional, paciência, dedicação e educação.

À avó Kika pelo carinho e amizade e por estar sempre presente na minha vida.

Ao Luís, pela enorme paciência, pela confiança, pelo amor e pela ajuda imperativa na conclusão deste projeto.

À minha binómia Andreia Façanha pela compreensão, serenidade e segurança.

Às Amigas do Apartamento pela partilha, pela amizade e por me terem feito crescer.

À Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional das Beiras, aos professores e aos funcionários, com quem tive o prazer de me cruzar durante os últimos cinco anos e pelos conhecimentos transmitidos.

A todos, um enorme bem-haja.

## **Nota Prévia**

Ao longo deste trabalho irão ser apresentados termos na língua inglesa cuja tradução não foi realizada com vista à manutenção do seu significado original. A classificação de proteínas de acordo com um sistema de classificação de ontologias pressupõe a sua utilização em língua Inglesa, por forma a evitar ambiguidades e perdas de significado do ponto de vista biológico.

## **Resumo**

**Introdução:** O uso de contraceptivos orais gera níveis séricos elevados de progesterona e estrogénios, cujos recetores específicos também se encontram em tecidos orais, podendo desta forma exercer alterações no estado de saúde oral da mulher.

A utilização de aparelho ortodôntico pelas mulheres, ao poder comprometer uma eficiente higienização oral, pode eventualmente constituir um fator adicional para a ativação dos mecanismos de resposta imunológica.

Encontrar soluções de diagnóstico molecular facilitará a avaliação precoce e o acompanhamento de desequilíbrios da saúde oral.

**Objetivos:** Estratégias de avaliação global de perfis moleculares em saliva permitem caracterizar estados de saúde e de evolução para a doença. A caracterização do perfil total de proteínas presentes na saliva, em fases do ciclo hormonal em mulheres com toma de contraceptivos combinados em portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico, permitirá: 1- Estabelecer se há proteínas diferentemente expressas na saliva ao longo do ciclo hormonal e se estas permitem caracterizar fases do ciclo; 2- Estabelecer se a utilização de aparelho ortodôntico induz alterações na expressão de proteínas ao longo do ciclo e se é possível identificar proteínas relacionadas com alterações da resposta imune; 3- Validar a ferramenta SalivaPrint Toolkit, para identificar a fase do ciclo hormonal em indivíduos portadores e não portadores de aparelho ortodôntico.

**Materiais e Métodos:** Recolha e processamento de saliva em mulheres com terapia hormonal contraceptiva combinada, em portadoras e em não portadoras de aparelho ortodôntico. A determinação dos perfis totais de proteínas foi realizada por eletroforese capilar em micro-chips. A identificação das proteínas representadas pelo perfil de eletroforese foi obtida através da base de dados SalivaTecDB. Os mecanismos moleculares em que participam as proteínas selecionadas foram determinados com recurso a ferramentas bioinformáticas.

**Resultados:** Foram recolhidas amostras de saliva a 32 mulheres saudáveis, 17 portadoras de aparelho ortodôntico e 15 não portadoras de aparelho ortodôntico.

A análise estatística dos parâmetros salivares e clínicos mostraram não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos.

A comparação dos perfis totais de proteínas demonstra diferenças na expressão de proteínas ao longo do ciclo hormonal. O mesmo se verifica no perfil de expressão de proteínas entre as populações portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.

Foram também identificadas proteínas as Kallikrein, implicadas em diversos processos fisiológicos e patológicos e que podem vir a constituir importantes biomarcadores para avaliar a saúde oral com fases do ciclo hormonal.

**Conclusões:** Foram pela primeira vez estabelecidas estratégias moleculares, nomeadamente a utilização do perfil total de proteínas presentes na saliva, para avaliar alterações da saúde oral eventualmente decorrentes da toma de terapia hormonal contraceptiva combinada.

Os resultados do trabalho permitiram também estabelecer uma estratégia molecular que permite a avaliação da saúde oral em mulheres portadoras de aparelho ortodôntico e que estejam com terapia hormonal contraceptiva combinada.

**Palavras-chave:** Proteínas na saliva e ciclo hormonal; Proteínas e contraceptivos orais combinados; Proteínas e tratamento ortodôntico.

## **Abstract**

**Introduction:** The use of oral contraceptives generates elevated serum levels of progesterone and estrogens, whose specific receptors are also found in oral tissues, and may therefore alter the woman's oral health status.

The use of orthodontic appliances by women, because they can compromise an efficient oral hygiene, may eventually be an additional factor for the activation of immune response mechanisms.

Finding molecular diagnostic solutions will facilitate the early assessment and monitoring of oral health imbalances.

**Objectives:** Strategies of global assessment of molecular profiles in saliva allow to characterize health status and evolution for the disease. The characterization of the total protein profile present in the saliva, in phases of the hormonal cycle in women with combined contraceptives in carriers and without orthodontic appliance, will allow: 1 - To establish if there are proteins differently expressed in the saliva throughout the hormonal cycle and if they allow to characterize phases of the cycle; 2- Establish if the use of orthodontic appliance induces changes in the expression of proteins along the cycle and if it is possible to identify proteins related to alterations of the immune response; 3- Validate the tool SalivaPrint Toolkit, to identify the phase of the hormonal cycle in individuals with and without orthodontic appliances.

**Materials and Methods:** Saliva collection and processing in women with combined contraceptive hormone therapy in patients with and without orthodontic appliances. The determination of the total protein profiles was performed by capillary electrophoresis in microchips. The identification of the proteins represented by the electrophoresis profile was obtained through the SalivaTecDB database. The molecular mechanisms in which the selected proteins participate were determined using bioinformatic tools.

**Results:** Saliva samples were collected from 32 healthy women, 17 with orthodontic appliances and 15 without orthodontic appliances. Statistical analysis of salivary and clinical parameters showed no statistically significant differences between the 2 groups.

Comparison of total protein profiles demonstrates differences in protein expression throughout the hormonal cycle. The same happens in the protein expression profile between the groups with and without orthodontic appliance.

Also identified were kallikreins, implicated in various physiological and pathological processes and which may constitute important biomarkers to evaluate oral health with phases of the hormonal cycle.

**Conclusions:** For the first time molecular strategies were established, namely the use of the total protein profile present in the saliva, to evaluate changes in oral health, possibly resulting from combined contraceptive hormone therapy.

The results of the study also allowed the establishment of a molecular strategy that allows the evaluation of oral health in women with orthodontic appliances and who are undergoing combined contraceptive hormone therapy.

**Key words:** Proteins in the saliva and hormonal cycle; Combined oral proteins and contraceptives; Proteins and orthodontic treatment.

# Índice

Agradecimentos .....	IX
Abstract.....	XIII
Abreviaturas .....	XXI
<b>I. Introdução</b>	
1.1. Caracterização do ciclo hormonal feminino .....	4
1.2. Ciclo hormonal .....	4
1.3. Ciclo ovário.....	4
1.4. Ciclo Uterino.....	6
1.5. Mecanismos de ação dos contraceptivos Orais.....	8
1.6. Recetores de estrogénio e progesterona.....	8
1.7. Efeitos orais e sistémicos das hormonas sexuais.....	9
1.8. O aparelho ortodôntico e a saúde oral.....	10
2. Saliva .....	10
3. Diagnóstico Molecular .....	11
4. Objetivos .....	12
<b>I. Materiais e Métodos</b>	
5. Caracterização do Estudo e da População .....	18
5.1. Aplicação do Questionário.....	18
5.2. Avaliação do estado de saúde oral .....	18
5.3. Aplicação dos Critérios de Inclusão e Exclusão.....	20
6. Recolha, processamento e controlo de qualidade das Amostras de Saliva.....	21
6.1. Determinação do perfil total de proteínas – SalivaPrint .....	22
6.2. Análise do perfil total de proteínas – SalivaPrint .....	23
6.3. Análise Estatística dos resultados .....	25
<b>II. Resultados e Discussão</b>	
1. Caracterização da população.....	29
1.1. Caracterização do <i>status</i> de saúde oral da população.....	29
1.2. Caracterização da saliva através de parâmetros físico-químicos .....	34
2. Análise do perfil total de proteínas – SalivaPrint .....	38
<b>III. Conclusão .....</b>	<b>76</b>
<b>IV. Bibliografia.....</b>	<b>80</b>



Figura 1 – Concentrações padrão dos níveis de estrogênio e progesterona ao longo do ciclo hormonal, sem efeito de terapia hormonal. Retirado de Mariotti, A (1994 ) (9).....	7
Figura 2 – Fluxograma da metodologia do estudo .....	17
Figura 3 – Perfil exemplo resultante da análise do algoritmo SalivaPrint Toolkit. ....	23
Figura 4 – Comparação do Índice CPO na população portadora de aparelho ortodôntico e não portadora de aparelho ortodôntico.....	31
Figura 5 – Comparação de cada parâmetro do Índice CPO na população não portadora de aparelho ortodôntico e na população portadora de aparelho ortodôntico.....	31
Figura 6 – Comparação do Índice PSR na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico.....	32
Figura 7 - Comparação do Índice de Placa na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico. ....	33
Figura 8 – Comparação da variação do pH ao longo do ciclo hormonal nas duas populações em estudo. ....	35
Figura 9 - Concentração total de proteínas na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico ao longo das fases do ciclo hormonal. ....	36
Figura 10 - Comparação do Volume de Saliva nas duas populações em estudo em cada fase do ciclo.....	37
Figura 11 - Perfis de proteínas na fase início do ciclo hormonal em mulheres portadoras de aparelho ortodôntico.....	40
Figura 12 - Perfis de proteínas na fase início do ciclo hormonal em mulheres portadoras de aparelho ortodôntico após aplicação dos critérios de seleção. .	40
Figura 13 - Perfil Médio na fase início do ciclo hormonal de mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.....	41
Figura 14 - Perfis Médios na fase meio do ciclo hormonal de mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.....	42
Figura 15 - Perfis Médios na fase fim do ciclo hormonal de mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.....	43
Figura 16 - Perfis Médios na fase da menstruação do ciclo em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.....	44
Figura 17 – Perfil médio de todas as fases do ciclo hormonal na população portadora de aparelho ortodôntico. ....	44
Figura 18 - Perfil médio de todas as fases do ciclo hormonal na população não portadora de aparelho ortodôntico. ....	45
Figura 19 – Perfil diferença entre os perfis médios de todas as fases do ciclo hormonal da população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico. ...	45
Figura 20 - Kallikrein e suas funções. Adaptado de Stefanini et al. (70) .....	49
Figura 21 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 2 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico.....	50
Figura 22 – Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 4 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico.....	52

Figura 23 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 5 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico.....	54
Figura 24 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 2 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico.....	56
Figura 25 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 4 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico.....	57
Figura 26 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 5 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico.....	59
Figura 27 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 6 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico.....	60
Figura 28 - Influência bidirecional do sistema Kallikrein/kinin e da cascata de coagulação(79).....	65
Figura 29 - Perfil médio da fase do início do ciclo hormonal em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico. Apresentação do intervalo de massas moleculares e do número total das proteínas identificadas em cada pico. No pico 2, são descritas as proteínas que contribuem para as diferenças que ocorrem nesta fase do ciclo hormonal.....	66
Figura 30 - Perfil médio da fase do meio do ciclo hormonal em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico. Apresentação do intervalo de massas moleculares e do número total das proteínas identificadas em cada pico. No pico 4, são identificadas as proteínas que caracterizam esta fase do ciclo hormonal. ....	69
Figura 31 - Perfil médio da fase da menstruação do ciclo hormonal em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico. Apresentação do intervalo de massas moleculares e do número total das proteínas identificadas em cada pico. Nos picos 2, 5 e 6 é demonstrado as proteínas que identificam esta fase do ciclo hormonal. ....	73
Figura 32 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do início do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados. ....	90
Figura 33 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do início do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados. ....	90
Figura 34 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do meio do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados. ....	91
Figura 35 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do meio do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados. ....	91
Figura 36 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do fim do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados....	92

Figura 37 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do fim do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados....	92
Figura 38 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados. .....	93
Figura 39 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados. .....	93
Figura 40 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do meio do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.....	94
Figura 41 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do meio do ciclo na portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados. ....	94
Figura 42 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do fim do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.....	95
Figura 43 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do fim do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados.....	95
Figura 44 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase da menstruação na população portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.....	96
Figura 45 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase da na população portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados. ....	96

Tabela 1 - Critérios utilizados para determinação do Índice CPO.....	19
Tabela 2 - Tabela representativa dos critérios utilizados para preenchimento do PSR.....	20
Tabela 3 – Número de amostras de saliva recolhidas e processadas. ....	29
Tabela 4 – Fluxo Salivar na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico.....	38
Tabela 5 – Fluxo salivar ao longo do ciclo hormonal.....	38
Tabela 6 - Intervalos de massas moleculares e respetivo número de proteínas, correspondentes aos picos de cada um dos Perfis Médios obtidos para cada uma das fases do ciclo hormonal em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.....	47
Tabela 7 – Identificação das 12 proteínas exclusivas da fase do início do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico. ....	51
Tabela 8 - Identificação das 36 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico. ....	52
Tabela 9 - Identificação das 13 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico. ....	54
Tabela 10 - Identificação das 17 proteínas exclusivas da fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico. ....	56
Tabela 11 - Identificação das 12 proteínas exclusivas da fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico. ....	58
Tabela 12 - Identificação das 11 proteínas exclusivas da fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico. ....	59
Tabela 13 - Identificação das 25 proteínas exclusivas da fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico. ....	61
Tabela 14 – Número total de proteínas e número de proteínas exclusivas identificadas em cada pico, correspondentes às fases do ciclo hormonal, independentemente da população portadora ou não portadora de aparelho ortodôntico.....	63
Tabela 15 - Identificação das 12 proteínas exclusivas da fase do início do ciclo hormonal. ....	67
Tabela 16 - Identificação das 36 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo hormonal. ....	70
Tabela 17 - Identificação das 45 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo hormonal. ....	74

## **Abreviaturas**

**LH-** Hormona luteinizante

**FSH-** Hormona folículo-estimulante

**GnRH-** Hormona gonadotrofina

**COC-** contraceptivos orais combinados

**KLK -** *Kallikrein*



# I. Introdução



Os contraceptivos orais combinados são formulações que associam estrogénios a diversos progestágenos, sendo amplamente utilizados pela população feminina. Nos últimos anos houve uma crescente melhoria na perceção da qualidade de saúde da mulher, procurando-se uma harmonia na terapia hormonal através do uso de formulações com menores concentrações hormonais. Embora, para este estudo apenas seja alvo de análise a terapia anticoncepcional combinada, há uma ampla gama de formulações contraceptivas na indústria farmacêutica, variando quer nos constituintes, quer na via de administração.

No ano de 1960, nos Estados Unidos da América, surgiu a primeira pílula contraceptiva – Enovid™ - com concentrações hormonais de estrogénio e progestativo, respetivamente de 150µg e 9,85mg. Com o avanço da indústria farmacêutica, a efetividade da contraceção hormonal é garantida com concentrações mais baixas. Atualmente assiste-se à utilização de pílulas contraceptivas de terceira e quarta geração, sendo que as concentrações de estrogénio encontram-se entre 30µg e 20µg, respetivamente, paralelamente à diminuição da quantidade de progestativo (1–3).

Relativamente ao mecanismo de ação e à finalidade destes medicamentos têm como principal objetivo impedir a ovulação e a nidacção e por consequência a gravidez. Fisiologicamente com a terapia hormonal há uma estabilização dos níveis de estrogénio e progesterona durante os 21 dias de toma da pílula, que quando terminada surgirá a menstruação, simulando um ciclo normal, onde há a descamação e renovação das paredes internas do endométrio (4). Importa perceber que os contraceptivos hormonais simulam artificialmente um estado de gravidez. Durante a gestação a mulher lida com níveis de estrogénio e progesterona aumentados devido à sua secreção pela placenta e corpo amarelo/lúteo o que é simulado na terapia hormonal contraceptiva, uma vez que durante 21 dias há toma de uma quantidade contínua de estrogénio sintético e progestativo (1,5).

São conhecidas alterações orais que ocorrem durante a gestação e portanto estas também podem ser partilhadas pelas mulheres que usam contraceptivos hormonais (6).

### **1.1. Caracterização do ciclo hormonal feminino**

Iniciando-se com a menarca, há uma periodicidade de secreção de estrogénios e progesterona, permitindo a regulação das diferentes fases do ciclo hormonal ao longo de 28-30 dias. Neste sentido, é essencial a compreensão da fisiologia do ciclo hormonal sem a influência da terapia hormonal por recurso aos contraceptivos orais combinados, para que se possam perceber as variações séricas das hormonas esteroides ao longo de um ciclo hormonal.

### **1.2. Ciclo hormonal**

O ciclo hormonal é referido como o conjunto de alterações cíclicas que ocorrem nas mulheres maduras e não grávidas e que culminam na menstruação. Geralmente, o ciclo hormonal tem 28 dias, no entanto, difere de mulher para mulher, podendo variar de 18 dias a 40 dias. O primeiro dia da menstruação é considerado o início do ciclo hormonal, durando aproximadamente 4 a 5 dias, nesta fase o epitélio mucoso da cavidade uterina desprende-se da parede uterina e é expulso pelo útero. A ovulação acontece por volta do 14º dia de um ciclo de 28 dias, embora esta fase varie entre indivíduos. Neste sentido, o tempo decorrido entre o fim da menstruação e a ovulação é chamado por fase folicular (ciclo ovárico) devido ao rápido desenvolvimento dos folículos ováricos e também designado por fase proliferativa (ciclo uterino) devido à rápida proliferação da mucosa uterina. O tempo decorrente entre a ovulação e a menstruação do ciclo seguinte denomina-se fase luteínica (ciclo ovárico) devido à presença do corpo lúteo ou amarelo, sendo também descrita como fase secretora (ciclo uterino) devido à maturação e secreção das glândulas uterinas (4).

### **1.3. Ciclo ovárico**

Esta expressão relaciona-se apenas com os fenómenos ocorridos nos ovários numa mulher madura e não grávida durante o ciclo hormonal. Estes

fenómenos são controlados pela libertação de hormonas do complexo hipotálamo-hipófise, ou seja, o hipotálamo liberta a hormona gonadotrofina (GnRH), à qual a hipófise apresenta grande sensibilidade, esta, por sua vez, liberta a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH). Ambas estimulam o crescimento e desenvolvimento dos folículos bem como a secreção de estrogénios pelos folículos que não eclodiram, libertando o óvulo. A FSH exerce a sua principal função nas células granulosas e a LH, inicialmente, atua sobre a teca interna e depois nas células granulosas. As células da teca interna ao serem estimuladas pela LH produzem androgénios, os quais se deslocam para as células granulosas, estas células ao serem estimuladas pela FSH convertem os androgénios em estrogénios. A hormona FSH leva a que haja um aumento do número de recetores para LH nas células granulomatosas e os estrogénios aumentam o número de recetores para LH nas células da teca interna, havendo mais produção de estrogénios, e assim sucessivamente. Após os recetores de LH terem aumentado nas células granulosas, a LH estimula as células da teca interna a produzirem progesterona, a qual vai ser transformada em androgénios nas células da teca interna. Neste sentido, a constante produção de androgénios e a sua conversão em estrogénios leva a que haja um aumento gradual de estrogénios na fase folicular. Nesta fase há uma diminuição da FSH uma vez que há um feedback negativo derivado da libertação de inibina pelos folículos em crescimento, também o facto de os níveis de estrogénio aumentarem nesta fase aumentam o feedback negativo sobre a secreção de LH e FSH na hipófise. No entanto, os elevados níveis de estrogénio na fase folicular tardia começam a produzir um efeito de feedback positivo sobre a secreção de LH e FSH pela hipófise, ou seja, à medida que os níveis de estrogénio aumentam no sangue, maior será o estímulo necessário para este efeito de feedback positivo. Assim, há o pico de LH que inicia a ovulação e determina a transformação do folículo ovulado em corpo amarelo. Pouco tempo após a ovulação a produção de estrogénios decresce e a produção de progesterona aumenta, à medida que as células granulosas são convertidas em células de corpo amarelo. Após a formação do corpo amarelo as quantidades de progesterona são muito mais elevadas do que anteriormente e é produzido algum estrogénio. Estas concentrações elevadas provocam um efeito de feedback negativo sobre a libertação de GnRH pelo hipotálamo, assim, a

secreção de LH e FSH pela hipófise diminui, conseqüentemente o estrogénio e a progesterona causam uma diminuição do número de recetores da GnRH da hipófise, tornando esta menos sensível à GnRH. Assim, haverá uma diminuição da secreção de LH e FSH pela hipófise e, portanto, há um decréscimo acentuado de ambas as hormonas após a ovulação (4).

#### **1.4. Ciclo Uterino**

Ciclo uterino corresponde às modificações derivadas do estrogénio e progesterona que ocorrem no endométrio durante o ciclo hormonal numa mulher madura não grávida. Após a menstruação o endométrio volta a proliferar, há uma atividade mitótica rápida das células epiteliais remanescentes, substituindo a camada funcional de células que se desprende durante a menstruação. As células inicialmente são aplanadas e cúbicas passando para um manto de células cilíndricas, a mucosa pregueia-se dando origem às glândulas espirais de forma tubular. Após 21 dias do ciclo hormonal ter-se iniciado, o endométrio encontra-se capaz de receber a massa embrionária.

O estrogénio determina a proliferação das células do endométrio, atua também sobre as células do tecido uterino, tornando-o mais sensível à progesterona, aumentando o número de recetores a esta hormona. Após a ovulação, a progesterona produzida pelo corpo amarelo liga-se a estes recetores, resultando numa hipertrofia celular tanto do endométrio como do miométrio. Caso não haja fecundação, o corpo amarelo degenera pelo que os níveis de LH e FSH diminuem também, logo o revestimento da cavidade uterina também começa a degenerar, as artérias espirais contraem-se cada vez mais à medida que a progesterona diminui e as glândulas espirais entram em isquémia e necrosam. Entretanto as células que se tornam necróticas desprendem-se e juntamente com algum sangue proveniente das artérias espirais formam o fluxo hormonal, que será expulso pelo cólo do útero pela contração da musculatura uterina devido à diminuição da progesterona e aumento do nível de moléculas inflamatórias (4).

As alterações relacionadas com a puberdade, tais como a modificação corporal resultante do desenvolvimento esquelético e muscular, desenvolvimento do sistema cardiorrespiratório e reprodutor, são causadas pela elevada taxa de estrogénios e de progesterona produzidas pelos ovários. Antes desta fase, ambas as hormonas eram produzidas em pequenas quantidades, o mesmo acontecia com as concentrações das hormonas LH e FSH que permaneciam em concentrações baixas. Estes níveis reduzidos devem-se à ausência duma hormona produzida pelo hipotálamo, denominada GnRH. Na puberdade, há uma secreção aumentada da GnRH, LH e FSH, sendo que as duas últimas são secretadas de forma cíclica, caracterizando o ciclo hormonal feminino através da indução de um ciclo ovárico, uterino e hormonal que se prolonga até à fase da menopausa (4,7,8).

Neste sentido, os níveis de progesterona e estrogénio na circulação sanguínea variam de acordo com a fase do ciclo hormonal, em situações fisiológicas onde não há o efeito de terapia hormonal combinada. Na literatura encontram-se gráficos como o da Figura 1, onde é possível verificar as alterações das concentrações séricas de ambas as hormonas.

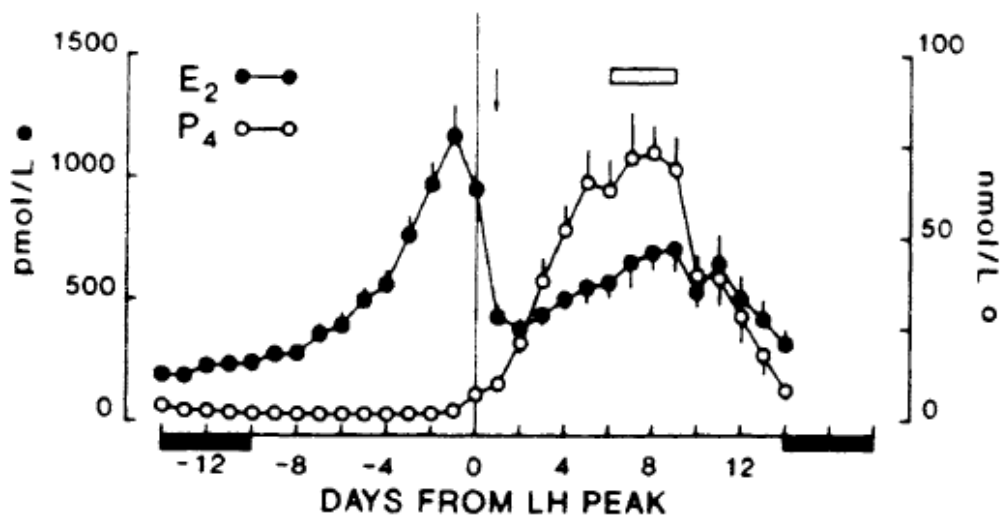


Figura 1 – Concentrações padrão dos níveis de estrogénio e progesterona ao longo do ciclo hormonal, sem efeito de terapia hormonal. Retirado de Mariotti, A (1994) (9).

## **1.5. Mecanismos de ação dos contraceptivos Orais**

Os contraceptivos orais combinados (COC) reduzem os níveis de GnRH no sangue devido ao mecanismo de feedback negativo da progesterona, assim o hipotálamo ao libertar menos quantidade da hormona GnRH, a hipófise vai libertar uma menor quantidade de FSH e LH. Neste sentido, vai haver uma inibição do desenvolvimento folicular e, por conseguinte, uma diminuição dos níveis de estrogénios que impossibilitará a ocorrência do mecanismo de feedback positivo. Assim, a hormona LH não atingirá o pico de concentração necessário para que ocorra a ovulação (10). Por outro lado, o COC ao serem constituídos por estrogénio e progesterona, o primeiro provoca um feedback negativo de estrogénio na hipófise, o qual, resultará numa redução da secreção da hormona FSH, inibindo também o desenvolvimento folicular (11).

## **1.6. Recetores de estrogénio e progesterona**

As hormonas esteroides ao possuírem recetores em várias células do organismo, tais como o útero, glândula mamária, hipotálamo, ossos, vasos sanguíneos, intestino, pulmão, sistema neurológico, leucócitos e próstata, têm uma ampla aplicação na regulação funcional dessas células no organismo, sendo responsáveis por processos de proliferação celular, diferenciação e crescimento (12–14).

A descoberta da presença de recetores específicos para estrogénio e progesterona nos tecidos periodontais de suporte permitiu estabelecer uma relação entre as variações hormonais e o estado de saúde oral encontrado na mulher (15–17). É conhecido que a ativação dos recetores leva a uma acumulação das hormonas nestes tecidos, bem como estimula a expressão de mais recetores pelas células envolvidas (18).

Na literatura descreve que as hormonas sexuais podem influenciar a saúde dos tecidos periodontais, promovendo por exemplo alterações na produção de citocinas e na indução também de alteração do microbioma subgingival (19,20).

Sendo pertinente neste sentido perceber se a resposta imunológica pode ser regulada pelas hormonas sexuais.

### **1.7. Efeitos orais e sistémicos das hormonas sexuais**

Na cavidade oral é conhecido que modificações na resposta inflamatória dos tecidos periodontais, favorecem o desenvolvimento de bactérias relacionadas com a disbiose que caracteriza a doença periodontal como a *Prevotella intermédia* e a *Capnocytophaga* (21). Está retratado na literatura o efeito da progesterona e do estrogénio na diferenciação e crescimento de células do periodonto, especialmente dos queratinócitos e fibroblastos (22). Neste sentido, existem duas teorias explicativas do efeito das hormonas no tecido periodontal. Por um lado, surge a hipótese de causarem uma mudança da eficácia da barreira epitelial durante as agressões bacterianas e, por outro lado, a hipótese das hormonas influenciarem a síntese e manutenção do colagénio fibroso dos tecidos periodontais. Pode afirmar-se que tanto o estrogénio como a progesterona alteraram a resposta imunológica pois modelam a expressão de citocinas, e aumentam os mecanismos de apoptose celular (5,15). A progesterona estimula a produção de prostaglandina E2, aumenta a acumulação de leucócitos polimorfonucleares no sulco gengival e aumenta a produção de IL-6 pelos fibroblastos gengivais (16). Ambas as hormonas têm um efeito no sistema microcirculatório, levando à presença de edema das células endoteliais e das vénulas, aderência de granulócitos e plaquetas às paredes dos capilares, formação de microtrombos, desgranulação dos mastócitos perivasculares e aumento da permeabilidade vascular, obtendo-se um quadro clínico de gengivite onde existe sangramento, inflamação e edema (15,23).

A nível sistémico são também conhecidas alterações provocadas pela concentração não fisiológica das hormonas sexuais na corrente sanguínea. É reconhecido na literatura o risco aumentado para o acometimento de complicações cardíacas e venosas (enfarte agudo do miocárdio, trombose, acidente vascular cerebral, aumento da pressão arterial), alterações no sistema nervoso e gastrointestinal (24–29).

Tendo em conta os efeitos das hormonas sexuais descritos pela literatura, encontrar as evidências moleculares que caracterizam a eventual desregulação dos mecanismos são um contributo importante para o estabelecimento de estratégias de diagnóstico.

### **1.8. O aparelho ortodôntico e a saúde oral**

É reconhecido pela literatura que a utilização de aparelho ortodôntico, pode ter implicações na maior suscetibilidade à retenção de placa bacteriana nas zonas das bandas, brackets e arames devido à dificuldade de higienização (30,31). É frequente nestes indivíduos, a presença de um quadro clínico de gengivite induzida por placa, onde se observa a profundidade de sondagem aumentada, sangramento exacerbado, hiperplasia gengival e um alto índice de cárie, notando-se descalcificações dentárias, lesões iniciais de cárie, lesões brancas de esmalte que rapidamente podem evoluir para cáries nas superfícies coronais dos dentes (32). Está descrito que a acumulação de placa bacteriana é independente do tipo de aparelho ortodôntico usado, quer seja o tradicional ou o auto-ligável. Estudos indicam que ambos produzem respostas similares no que concerne à placa bacteriana acumulada e à resposta inflamatória gengival (30). Neste sentido, é interessante perceber se ao longo do ciclo hormonal existem proteínas diferentemente expressas principalmente as relacionadas com os mecanismos de resposta imunológica que conduzem à resposta inflamatória.

## **2. Saliva**

A saliva é um fluido secretado pelas glândulas salivares diretamente na cavidade oral, sendo constituída por água (99%) e por uma mistura complexa de eletrólitos (sódio, potássio, cloro, magnésio, bicarbonato e fosfato), proteínas (enzimas, imunoglobulinas e fatores antimicrobianos), glicoproteínas (albumina e outros polipéptidos e oligopéptidos) e pequenas quantidades de glicose e produtos nitrogenados, onde se destacam as proteínas, assumindo um relevante papel para a execução deste trabalho (33,34). Segundo Greabu et al. (2009) (33) é o

fluido biológico mais disponível e que pode ser recolhido de forma não invasiva. Existem três pares de glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) e inúmeras glândulas menores, localizadas principalmente na mucosa que estão continuamente a secretar para a cavidade oral saliva. A cavidade oral é um meio muito complexo, que para além de ser o “espelho da saúde do corpo”(33), 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 (33,35).

A saliva é atualmente utilizada para diagnóstico precoce e monitorização de patologias orais ou sistémicas (36,37).

### **3. Diagnóstico Molecular**

O diagnóstico molecular é baseado principalmente na investigação realizada nas áreas de genómica, proteómica e transcriptómica. Estas técnicas permitem desvendar fenómenos moleculares associados a diferentes perfis funcionais que caracterizam os fenótipos de diferentes indivíduos como método de proporcionar uma medicina de precisão. Os resultados das diversas ciências ómicas revelam informações moleculares que permitem identificar vias desreguladas em certas situações de saúde e doença. Todo este avanço irá permitir num futuro próximo o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, um melhor prognóstico (38,39).

Técnicas como a eletroforese capilar permitem hoje separar as proteínas presentes num determinado fluido, como a saliva, por forma a ser estabelecido um perfil que retrate os acontecimentos moleculares que estão a ocorrer em determinado momento – um SalivaPrint (40). Com o recurso a bases de dados como a SalivaTec DB (<http://salivatec.viseu.ucp.pt/salivatec-db>) que contem a informação sobre as proteínas presentes na saliva é possível saber quais são as proteínas que estão a contribuir para ser estabelecido um determinado perfil. As estratégias informáticas de inteligência artificial como as desenvolvidas no laboratório SalivaTec da Universidade Católica Portuguesa, permitem por um lado estabelecer perfis característicos de determinada situação funcional ou

clínica (40) e adicionalmente com o recurso a ferramentas bioinformáticas disponíveis para toda a comunidade científica, é possível saber quais os processos biológicos alterados, representados pelas proteínas que foram identificadas a partir do SalivaPrint.

#### 4. Objetivos

Atualmente, existem exames de diagnóstico capazes de determinar a fase do ciclo hormonal da mulher, com o intuito, na maioria das vezes, de identificar a fase da ovulação. Neste sentido, podem ser realizadas dosagens hormonais através da punção sanguínea; ultrassonografia transvaginal seriada realizada, também, ao longo do ciclo hormonal, percebendo-se diretamente através da morfologia do folículo qual a fase ovárica presente. Por fim, pode ser também usada a biópsia do endométrio, a qual fornece material para o exame microscópico da ação direta das hormonas no tecido. No entanto, estes métodos de diagnóstico, embora eficazes e precisos, são considerados demasiado invasivos e de resposta demorada. Por isso, é necessária uma abordagem eficiente e não invasiva, onde apenas num momento haja a recolha de saliva e determinação imediata da fase do ciclo hormonal.

Durante o ciclo hormonal a mulher portadora de aparelho ortodôntico e que usa contraceptivos orais combinados poderá estar mais exposta a alterações da sua saúde oral? As alterações podem ser identificadas através da avaliação do perfil total de proteínas presentes na saliva?

Estratégias de avaliação global de perfis moleculares em saliva permitem caracterizar estados de saúde e de evolução para a doença.

**Objetivos:** A caracterização do perfil total de proteínas presentes na saliva (SalivaPrint), em fases do ciclo hormonal em mulheres com toma de contraceptivos combinados em portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico, permitirá:

- 1- Estabelecer se há proteínas diferentemente expressas na saliva ao longo do ciclo hormonal e se estas permitem identificar a fase do ciclo;

- 2- Estabelecer se a utilização de aparelho ortodôntico induz alterações na expressão de proteínas ao longo do ciclo e se é possível identificar proteínas relacionadas nomeadamente com alterações da resposta imune.
- 3- Validar a ferramenta SalivaPrint Toolkit, para identificar a fase do ciclo hormonal em indivíduos portadores e não portadores de aparelho ortodôntico.



# **I. Materiais e Métodos**



Para a realização do enquadramento teórico deste trabalho, foram utilizados estudos e artigos de revisão científica e livros científicos, disponíveis na biblioteca da Universidade Católica Portuguesa. Para a pesquisa bibliográfica eletrónica, foi utilizado como motor de busca a PUBMED, Science Direct, Scielo e o Google Académico, não foi estabelecido limite temporal e os idiomas escolhidos foram o Português e o Inglês. As palavras-chave utilizadas foram: Oral Health; hormonal cycle; protein profile in saliva; combined oral contraceptives; orthodontic treatment.; Sexual Hormones; Estrogen; Progesterone; orthodontic treatment; dental plaque; bacterial plaque.

Para conseguirmos, responder aos objetivos propostos neste trabalho foi seguida a estratégia e metodologia resumida abaixo (Figura 2).

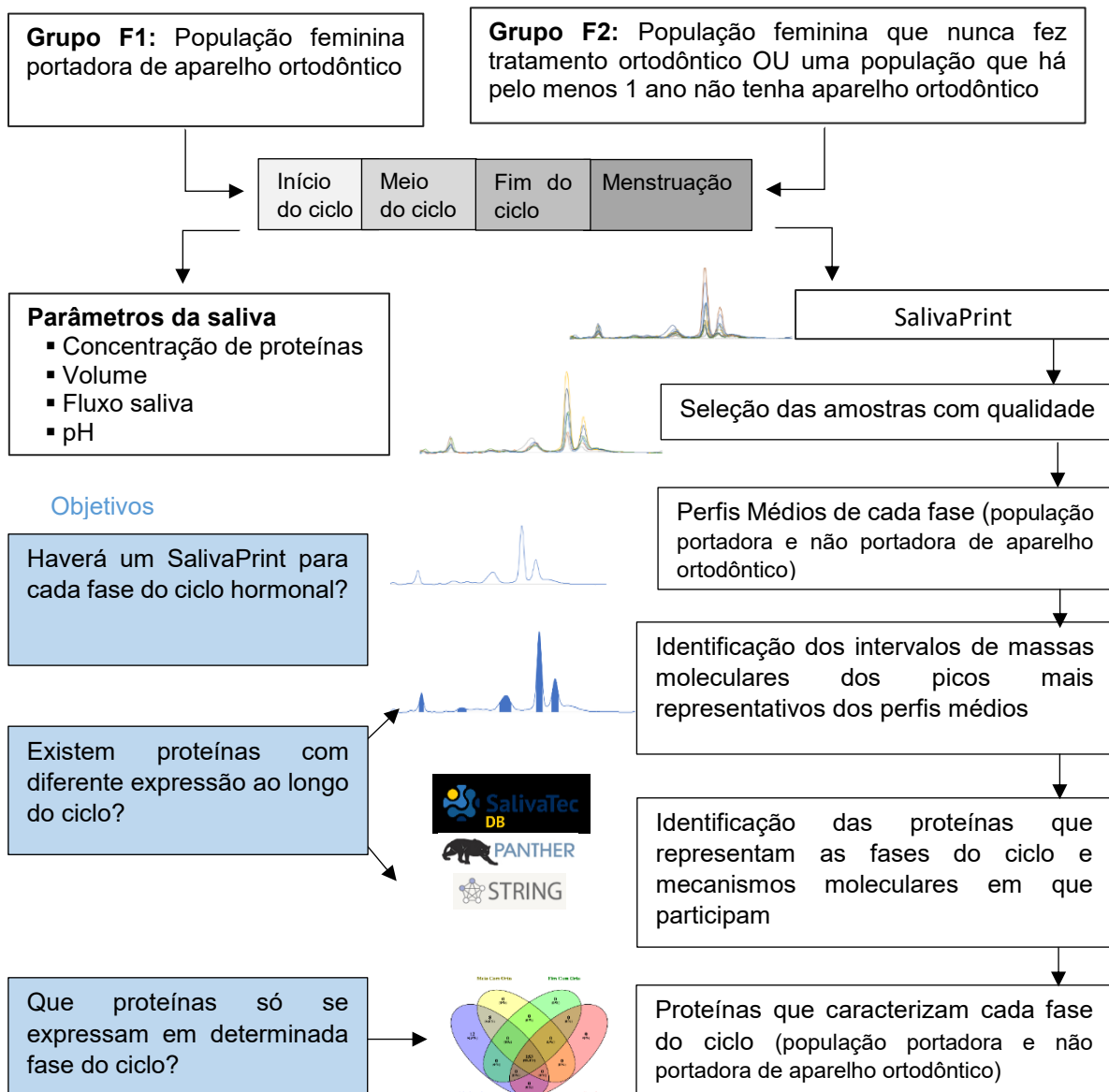


Figura 2 – Fluxograma da metodologia do estudo 17

## **5. Caracterização do Estudo e da População**

O estudo observacional transversal, comporta quatro momentos de observação ao longo de um mês. A amostra é constituída por estudantes saudáveis da Universidade Católica Portuguesa, do género feminino que utilizam terapia hormonal com contraceptivos orais combinados há pelo menos 1 ano. A esta população foi apresentado o Consentimento Informado (Anexo 1) o qual foi assinado e foram aplicados os instrumentos de avaliação clínica do *status* de saúde oral, onde foi examinado, individualmente, o índice de placa, índice de sangramento, preenchido o PSR e encaminhamento dos indivíduos para cada grupo, consoante a presença ou ausência de aparelho ortodôntico. A população em estudo é constituída por alunas inscritas em anos mais avançados do curso, já em ambiente clínico, pois é um elemento facilitador para o controlo das recolhas de saliva ao longo das fases do ciclo hormonal.

**Grupo F1:** População feminina portadora de aparelho ortodôntico;

**Grupo F2:** População feminina que nunca fez tratamento ortodôntico OU uma população que há pelo menos 1 ano não tenha aparelho ortodôntico;

### **5.1. Aplicação do Questionário**

O questionário (Anexo 2) foi aplicado como forma de obter informação individualizada da população em estudo. Foram recolhidos dados úteis ao estudo, tais como referentes à saúde sistémica e oral, à toma de medicação diária habitual, tratamento recente com antibióticos ou corticosteroides, bem como a hábitos tabágicos e consumo de bebidas alcoólicas.

### **5.2. Avaliação do estado de saúde oral**

O estado de saúde oral foi avaliado segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (41). Primeiramente foram recolhidos dados correspondentes ao índice CPO, de acordo com os critérios da Tabela 1, onde

são identificados os dentes cariados, restaurados ou ausentes em boca. Em seguida, iniciou-se a análise periodontal, preenchendo-se o PSR (Periodontal Screening and Recording Index) de acordo com a escala fornecida pela OMS, Tabela 2. 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. Todos os exames clínicos foram realizados pelo mesmo profissional de saúde. A ocorrência de sangramento à sondagem foi observada até 7 segundos após a remoção da sonda do sulco, anotando-se como presente caso o sangramento perdurasse após o tempo determinado (23).

Por último, com o intuito de quantificar o índice de placa, foi empregue em todas as faces dentárias um revelador de placa (eritrosina), procedendo-se à contagem das faces coradas pelo revelador, dividindo este valor pelo número total de faces dentárias, multiplicando por 100, obtendo-se a percentagem de placa de cada indivíduo (23).

*Tabela 1 - Critérios utilizados para determinação do Índice CPO.*

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

Tabela 2 - 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 muco-gengivais

### 5.3. Aplicação dos Critérios de Inclusão e Exclusão

Para a escolha dos indivíduos candidatos ao estudo foram aplicados os seguintes critérios de inclusão e exclusão.

#### Critérios de inclusão:

- a) Índice de Sangramento  $\leq$  10% à sondagem (23);
- b) Índice de Placa  $\leq$  25%, (23);
- c) Profundidade de Sondagem  $\leq$  3mm com a sonda Click-Probe® (23);
- d) Sem perda de inserção (23);
- e) Ausência de terapia antibiótica nos últimos 30 dias ou de corticosteroides nos últimos 9 meses (42);
- f) Ausência de hábitos tabágicos (43);
- g) Hábitos de higiene oral pelo menos 2x/dia (44);
- h) Uso da mesma Pílula há, pelo menos, 1 ano;

- i) **Apenas para o Grupo F2**, que não tenham aparelho ortodôntico/contenção fixa ou que o/a tenham retirado há, pelo menos, 1 ano (45).

**Critérios de exclusão:**

- a) Presença de doenças gengivais, tais como: gengivite, periodontite ou hiperplasia gengival;
- b) Presença de prótese fixa: coroas totais ou parciais, pontes, implantes, facetas, incrustações, independentemente do material utilizado (46);
- c) Uso de colutórios/ medicação tópica oral prescritos pelo Médico Dentista ou Generalista (47);
- d) Uso de pílulas não combinadas;
- e) Uso descontinuado da pílula durante os 12 meses precedidos ao exame;
- f) Presença de patologias ginecológicas, tais como: ovários poliquísticos, mioma uterino, endometriose e cistite (48,49);
- g) Presença de doenças sistêmicas (50);
- h) Presença de piercings intraorais (51).

**6. Recolha, processamento e controlo de qualidade das Amostras de Saliva**

O processamento e armazenamento das amostras de saliva foram realizados de acordo com o protocolo de controlo de qualidade de amostras estabelecido no SalivaTec (35). Este estudo contemplou a realização de 4 recolhas de saliva ao longo de um ciclo hormonal, por isso, foram avaliados os seguintes tempos: início, meio, fim do ciclo e menstruação. Considerando o início como o dia seguinte à toma da 1ª pílula do blister, o meio como o 14º dia da toma da pílula, o fim como o dia seguinte à toma da última pílula do blister e, por fim, a recolha correspondente à menstruação é recolhida no dia seguinte ao início da mesma.

Diferentes procedimentos podem ser utilizados para a obtenção de amostras de saliva. O método utilizado para a recolha foi o não estimulado, neste caso o fluido foi obtido sem qualquer estimulação. Uma vez que o volume salivar e a concentração total de proteínas são influenciados pelo horário da recolha, estação do ano, posição do paciente, estado de hidratação, idade, uso de medicamentos e muitos outros fatores (33) o procedimento de recolha foi feito sempre nas mesmas condições para estes parâmetros. Nesse sentido, solicitou-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 fizeram um bochecho durante 30 segundos para remover restos alimentares, células epiteliais descamadas e microrganismos. Após esta fase, é aguardado um minuto até 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 plástico.

Seguidamente, procedeu-se à centrifugação das amostras a 10.000 xg, durante 10 minutos, a 4°C e recolheu-se o sobrenadante. Com a saliva obtida avaliaram-se os seguintes parâmetros salivares: volume total (usando uma micropipeta), a concentração de proteína (através do NanoVue™) e o pH (utilizando um microeléctrodo Hanna HI1083B) (35).

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

### **6.1. Determinação do perfil total de proteínas – SalivaPrint**

O perfil total de proteínas da saliva (SalivaPrint) é 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. Resumidamente, 4 µL de amostra são misturados com 2 µL de um tampão redutor e fervidos durante 10 minutos a 95-100 °C. Posteriormente adicionam-se 84 µL de água ultrapura a cada amostra. Cada chip é impregnado com o 12 µL

gel e com o gel *staining* e carregado com 6  $\mu$ L de cada amostra preparada como descrito acima.

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 (35). 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.

## 6.2. Análise do perfil total de proteínas – SalivaPrint

A análise dos perfis obtidos é feita recorrendo à ferramenta SalivaPrint Toolkit (figura 3).

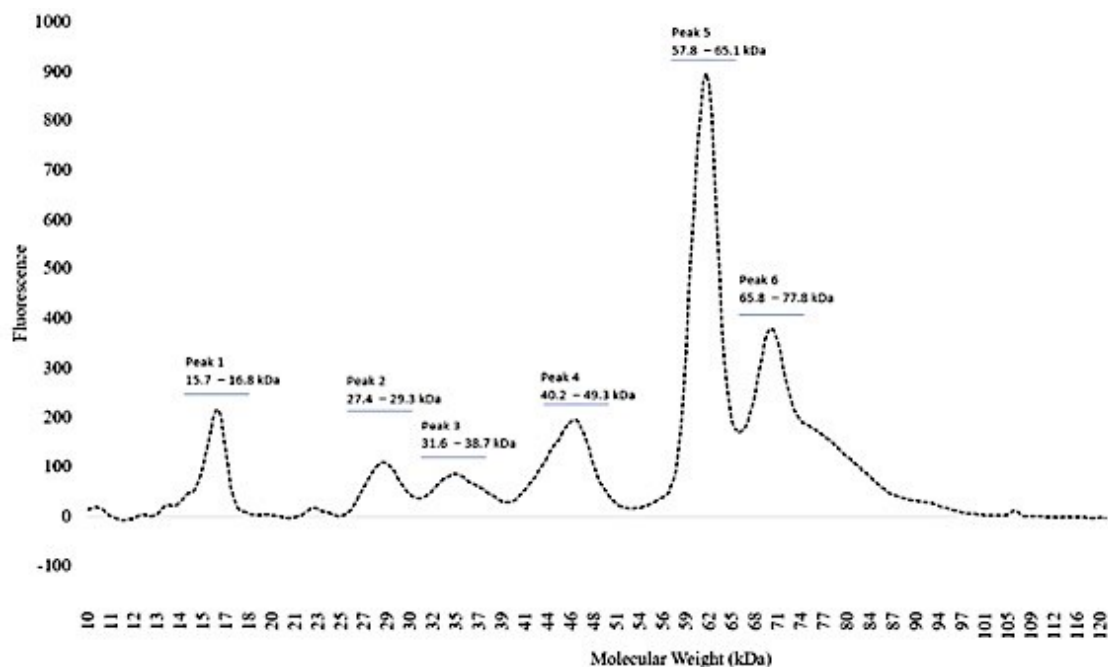


Figura 3 – Perfil exemplo resultante da análise do algoritmo SalivaPrint Toolkit.

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.

O algoritmo SalivaPrint Toolkit permite a criação de perfis médios e a identificação dos intervalos de massas moleculares em que estão presentes 6 picos principais. Existem evidências noutras patologias que 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 típicos de mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico e que estejam em terapia hormonal contraceptiva combinada com a finalidade de identificar se há proteínas diferentemente expressas e que eventualmente possam servir para caracterizar cada fase do ciclo e, por outro lado, estabelecer se o perfil de proteínas ao longo do ciclo hormonal é influenciado pela presença de aparelho ortodôntico.

Assim, para a identificação das gamas de proteínas que melhor diferenciam os perfis característicos de cada fase do ciclo na população portadoras e não portadora de aparelho ortodôntico foram determinados os perfis médios de proteínas.

Adicionalmente, foram determinadas as proteínas exclusivas de cada fase do ciclo hormonal na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico, através da ferramenta Venny (53), para responder às seguintes questões: “Quais os mecanismos biológicos em que intervêm as proteínas identificadas?”, “Serão os mesmos mecanismos ao longo das quatro fases analisadas do ciclo hormonal?”, “Existirão mecanismos biológicos diferentemente representados nas diferentes fases do ciclo hormonal?”.

Para a identificação das proteínas encontradas foi necessário recorrer à base de dados SalivaTecDB (<http://salivatec.viseu.ucp.pt/salivatec-db>). Para responder às questões funcionais levantadas foi utilizado o sistema de classificação funcional PANTHER (protein analyses through evolutionary relationships) que consiste numa ferramenta bioinformática que permite a classificação das proteínas de acordo com a função que realizam. Neste sentido, com a utilização do PANTHER é possível descobrir funções moleculares, vias de sinalização, processos biológicos e componentes celulares onde se encontram (54, 55).

Na análise funcional das proteínas identificadas no decorrer da estratégia utilizada neste trabalho foi também utilizada a ferramenta bioinformática STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (56). Esta ferramenta permite identificar interações proteína-proteína diretas e indiretas, bem como determinar o enriquecimento em processos biológicos, funções moleculares e/ou vias de sinalização. A rede resultante pode ser inspecionada e rearranjada de forma interativa. Cada nó na rede representa uma proteína, assim como cada linha corresponde a uma interação conhecida ou prevista (57,58).

### **6.3. Análise Estatística dos resultados**

Os dados sociodemográficos e de saúde da população foram analisados através de testes não paramétricos: t-teste e *two-way* ANOVA unidirecional ordinário (Graph Pad PRISM versão 7.0, EUA). Foi utilizada uma significância de 95% para todos os parâmetros analisados estatisticamente.



## **II. Resultados e Discussão**



## 1. Caracterização da população

As recolhas de saliva foram realizadas a 32 raparigas da Universidade Católica Portuguesa, perfazendo-se um total de 108 recolhas correspondendo a 53 a portadoras de aparelho ortodôntico e 55 a não portadoras de aparelho ortodôntico. Foram realizadas 4 recolhas de saliva ao longo de um ciclo hormonal.

Após a aplicação dos critérios de qualidade para a seleção das amostras, em perfis (SalivaPrint) que apresentassem picos com fluorescência reduzida (devido a baixa concentração de proteínas e/ou degradadas) foram removidas do estudo. Assim neste trabalho são apresentados os resultados correspondentes a 79 amostras, correspondendo a 40 mulheres portadoras de aparelho ortodôntico e 39 não portadoras de aparelho ortodôntico (Tabela 3), permitindo a comparação entre as populações durante os diferentes passos da investigação.

Tabela 3 – Número de amostras de saliva recolhidas e processadas.

<b>Amostras de saliva</b>			
<b>Fases do ciclo hormonal</b>	<b>Nº de recolhas por fase do ciclo</b>	<b>Nº de recolhas da população portadora de aparelho ortodôntico</b>	<b>Nº de recolhas da população não portadora de aparelho ortodôntico</b>
<b>Início do ciclo</b>	n=28 / n=16	n=14 / n=7	n=14 / n=9
<b>Meio do ciclo</b>	n=30 / n=21	n=15 / n=11	n=15 / n=10
<b>Fim do ciclo</b>	n=25 / n=20	n=12 / n=11	n=13 / n=9
<b>Menstruação</b>	n=25 / n=20	n=12 / n=11	n=13 / n=11
<b>Total</b>	<b>n=108 / n=79</b>	<b>n=53 / n=40</b>	<b>n=55 / n=39</b>

### 1.1. Caracterização do *status* de saúde oral da população

Com base no questionário e no exame oral aplicado foi possível a caracterização dos participantes através de critérios indicadores do *status* de saúde oral. A análise comparativa entre as duas populações não mostrou diferenças estatisticamente

significativas nos parâmetros utilizados para a caracterização do estado de saúde oral, o que revela que os grupos em estudo, clinicamente são idênticos.

Para os três parâmetros analisados (Índice CPO, PSR e Índice de Placa) foi utilizado um teste não paramétrico uma vez que não passavam o teste da normalidade, foi utilizado o t-Test.

### **1.1.1. Índice CPO**

O Índice CPO é amplamente utilizado pela medicina dentária e recomendado pela OMS para medir e comparar a presença de cárie dentária, sendo os valores possíveis: dentes cariados, perdidos e obturados (59).

Para a população portadora de aparelho ortodôntico obteve-se uma média de  $2,12 \pm 2,26$  e para a população não portadora de aparelho ortodôntico uma média de  $3,07 \pm 3,08$ . A Figura 4 apresenta a distribuição do índice pelas 2 populações em estudo.

Embora não haja diferença estatisticamente significativa entre o índice CPO na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico, é possível verificar uma maior diferença na prevalência dos dentes obturados comparativamente aos dentes cariados e ausentes analisados em ambas as populações (Figura 5). Por outro lado, é na população não portadora de aparelho ortodôntico que o índice CPO surge mais aumentado, sendo a quantidade de dentes obturados que mais contribui para esta prevalência.

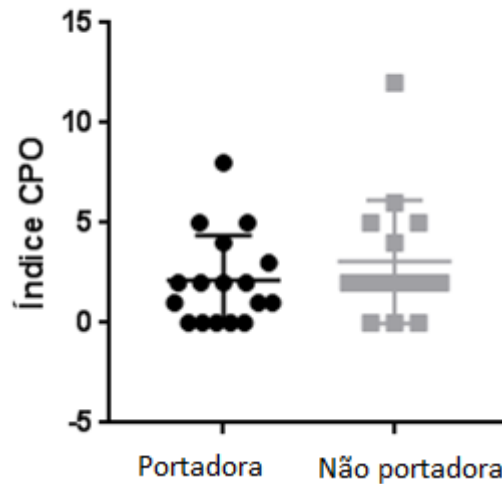


Figura 4 – Comparação do Índice CPO na população portadora de aparelho ortodôntico e não portadora de aparelho ortodôntico.

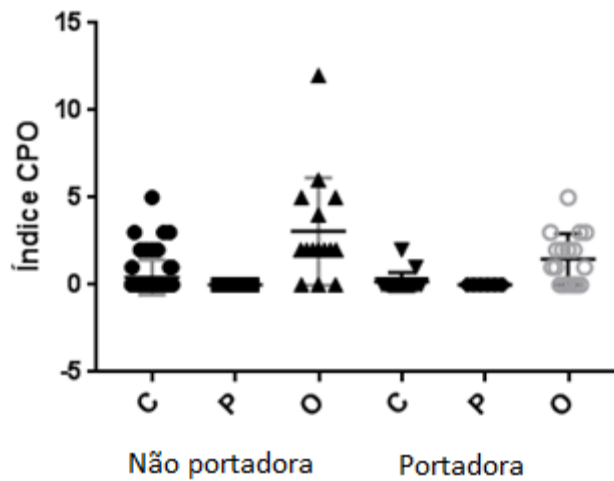


Figura 5 – Comparação de cada parâmetro do Índice CPO na população não portadora de aparelho ortodôntico e na população portadora de aparelho ortodôntico.

### 1.1.2. Status periodontal

O estado de saúde periodontal da população foi medido com o índice PSR (Periodontal Screening and Recording Index), não havendo diferença estatisticamente significativa entre as populações. Em média, para a população não portadora de aparelho ortodôntico obtiveram-se valores de  $1.33 \pm 0,72$  e para a população portadora de aparelho ortodôntico  $1,53 \pm 0,72$ .

Na Figura 6, pode-se verificar um ligeiro agravamento da saúde periodontal na população portadora de aparelho ortodôntico. Considerando que o tamanho da população portadora de aparelho ortodôntico corresponde a um valor de 17

iníviduos, pode ser afirmado que, sensivelmente, 65% da população apresenta-se com valor de PSR de 2. O que não é verificado na população não portadora de aparelho ortodôntico. Embora o nível 2 do PSR seja o com maior quantidade de indivíduos (7), em proporção com o tamanho da população, há uma distribuição dos indivíduos pelo nível 1 e 2 do índice. Sendo, aproximadamente, 40% da população correspondente ao nível 2, 40% ao nível 1 e os restantes 20 % representando o valor 0 do índice PSR.

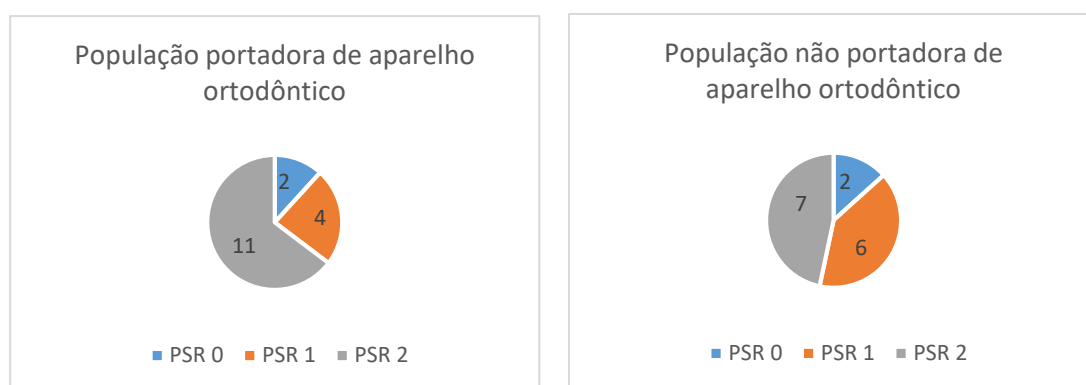


Figura 6 – Comparação do Índice PSR na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico.

### 1.1.3. Índice de placa

No índice de placa, os resultados não demonstram diferenças estatisticamente significativas, uma vez que os valores obtidos durante a análise oral dos participantes são semelhantes, embora se note na Figura 7 uma ligeira diferença, em média, apontando para níveis de placa superiores na população portadora de aparelho ortodôntico. Para a população não portadora de aparelho ortodôntico a média da percentagem da placa bacteriana visível encontra-se nos  $11,60 \pm 6,07\%$ , enquanto na população portadora de aparelho ortodôntico, em média, obteve-se  $12,82 \pm 5,86\%$ .

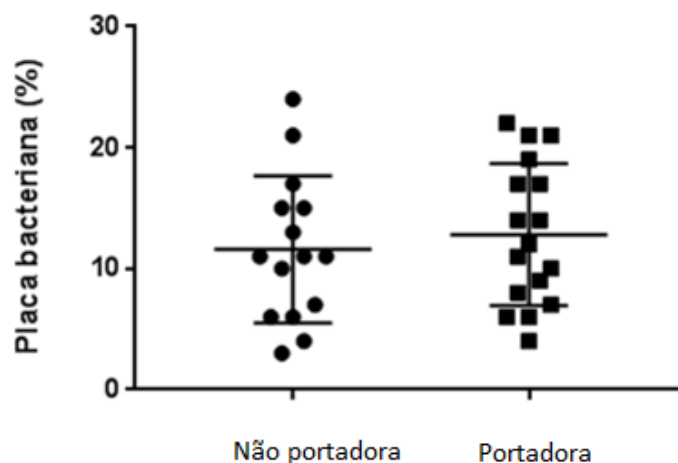


Figura 7 - Comparação do Índice de Placa na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico.

Os conhecimentos de saúde oral tendem a alterar os hábitos de higiene. Tendo em conta que a população é constituída por raparigas estudantes de Medicina Dentária, os seus conhecimentos na área da prevenção e higiene oral tendem a influenciar os hábitos de saúde oral. Segundo Freeman (1999) (60), os estudantes de saúde oral adquirem conceitos que podem alterar não só a sua própria higiene oral, mas também contribuir para a motivação dos seus pacientes para a aquisição dos corretos hábitos de saúde oral (60). A população utilizada mostra-se consistente com este estudo uma vez que apresenta valores indicadores do *status* oral compatíveis com níveis de saúde.

A caracterização oral (CPO, IP e PSR) realizada previamente à recolha de saliva indicou que não havia diferenças estatisticamente significativas, o que assemelhava ambas as populações. Estes valores refletem a consciencialização de ambos os grupos na importância de uma boa higiene oral, reforçada no caso da população portadora de aparelho ortodôntico. É consistente na literatura que durante o tratamento ortodôntico há um aumento das superfícies de retenção de placa bacteriana e, devido a isso, a grande maioria dos pacientes apresenta dificuldades na higiene, ocasionando valores mais elevados de placa bacteriana e consequentemente níveis mais elevados de sangramento gengival bem como maior propensão à cárie dentária. No entanto, segundo Heintze (1996) (61) o tratamento preventivo aliado à motivação e sensibilização dos pacientes portadores de aparelho ortodôntico constituem a base para uma boa higiene oral, compatíveis com valores

de saúde oral (61). Atendendo que a população do estudo é constituída por estudantes de Medicina Dentária, admite-se que estes conhecimentos são compreendidos e fundamentais para a educação e sensibilização dos seus pacientes, por esse motivo, as próprias estudantes adotam os comportamentos que sabem ser eficazes de forma a melhorarem a sua higiene oral. Assim sendo, os resultados obtidos para índice CPO, índice de placa e PSR para a população portadora de aparelho ortodôntico mostram-se expectáveis e em concordância com a literatura.

## **1.2. Caracterização da saliva através de parâmetros físico-químicos**

Foram processadas as amostras de saliva de todos os indivíduos do estudo, tendo sido avaliado o seu volume total, concentração de proteína, pH e fluxo salivar.

Durante a análise estatística, todos os parâmetros passaram o teste da normalidade pelo que foram analisados através de testes paramétricos, como o 2way ANOVA.

### **1.2.1.1. Variação do pH**

Não há diferença estatisticamente significativa no valor de pH da saliva entre as diferentes fases do ciclo, assim como não são verificadas diferenças estatisticamente significativas na comparação das populações portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico (figura 8).

Os valores de pH da saliva observados neste estudo, tanto para a população não portadora como portadora de aparelho ortodôntico ao longo das quatro diferentes fases do ciclo, situam-se entre 7,6 e os 7,8 o que vai de encontro à bibliografia, que apresenta valores entre 6,2 e 7,6 e onde se refere que a presença de aparelho ortodôntico não faz variar o valor de pH da saliva (62,63). É possível verificar a variação do pH ao longo das quatro fases, no mesmo indivíduo. Na maioria dos indivíduos, nota-se um decréscimo ligeiro no valor do pH, desde a fase inicial do ciclo hormonal até à menstruação, sendo esta a fase, em média, com menor valor de pH

encontrado, isto é, com 7,7. Em contrapartida, os valores correspondentes às restantes fases do ciclo hormonal apresentam valores mais elevados, sendo o valor médio no início do ciclo de 8,1 (64).

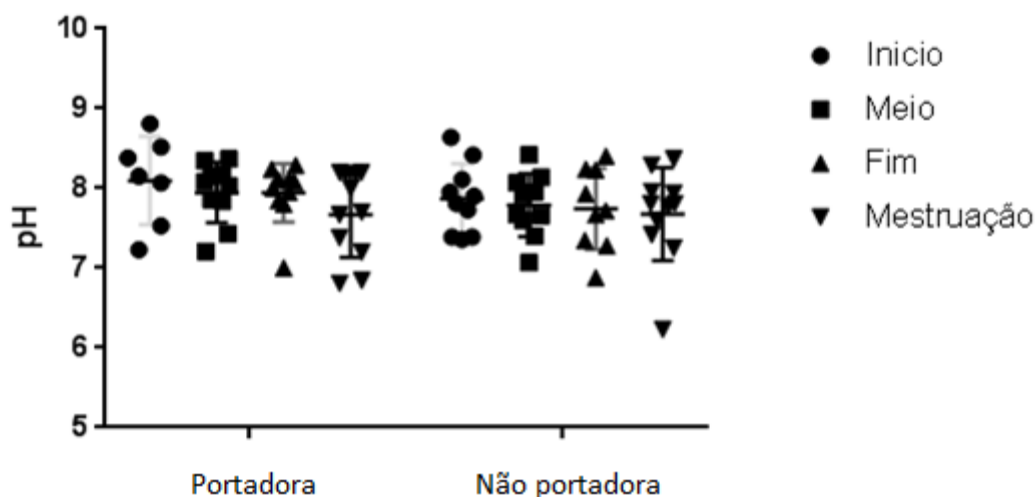


Figura 8 – Comparação da variação do pH ao longo do ciclo hormonal nas duas populações em estudo.

### 1.2.1.2. Concentração total de proteína

Na figura 9, é possível observar a variação da concentração total de proteína na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico. Na fase do início do ciclo hormonal ambas as populações apresentam valores de concentração total entre os 1750-2000  $\mu\text{g/ml}$ . Todavia, para a população não portadora de aparelho ortodôntico há um aumento na concentração total de proteínas até à fase do meio do ciclo hormonal (2150  $\mu\text{g/ml}$ ), sendo que para a fase do fim e da menstruação do ciclo hormonal há um decréscimo brusco dos valores da concentração total de proteínas para a população não portadora de aparelho ortodôntico, tendo um valor na menstruação de 1700  $\mu\text{g/ml}$ .

Pelo contrário, na população portadora de aparelho ortodôntico, a partir da fase do início do ciclo hormonal, há um decréscimo nos valores da concentração total de proteínas. Na fase do meio do ciclo hormonal foram encontrados valores de 1600  $\mu\text{g/ml}$  e na fase do fim do ciclo hormonal de 1550  $\mu\text{g/ml}$ . A partir desta fase a

concentração total de proteínas aumentou para valores de 2050 µg/ml na fase da menstruação.

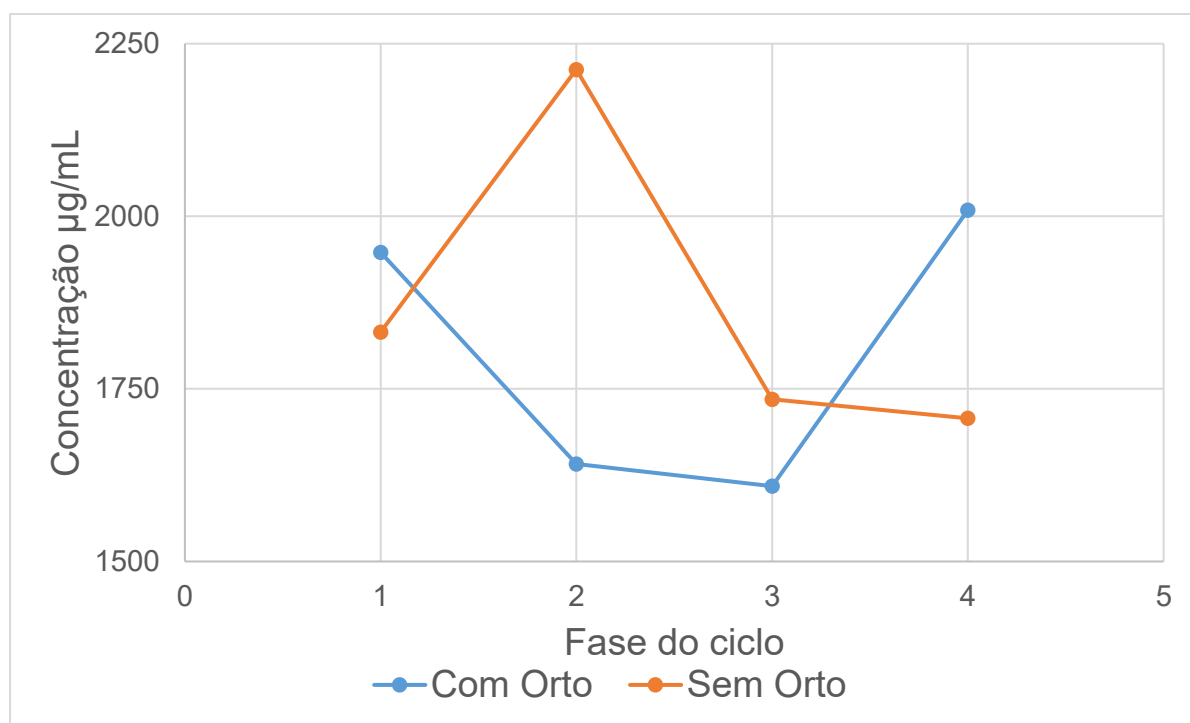


Figura 9 - Concentração total de proteínas na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico ao longo das fases do ciclo hormonal.

### 1.2.1.3. Volume total de saliva

Não há diferença estatisticamente significativa para o volume de saliva, quer comparando as quatro fases do ciclo entre si, quer comparando a população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico (figura 10).

O valores médios do fluxo salivar estão descritos na Tabela 4 e 5. É possível verificar um ligeiro aumento do fluxo salivar na população portadora de aparelho ortodôntico, embora não seja estatisticamente significativa. Por outro lado, avaliando o fluxo salivar ao longo das quatro fases do ciclo hormonal analisadas, embora não haja diferenças estatisticamente significativas, pode ser observado um ligeiro aumento no fluxo salivar na fase do meio do ciclo hormonal.

No que concerne ao volume total de saliva, estimado em µl, as médias de cada fase do ciclo hormonal na situação da população portadora de aparelho ortodôntico não apresentam diferença estatisticamente significativas assim como para a população não portadora de aparelho ortodôntico. Dutra et al. (2004) (65) para avaliar

a variabilidade clínica do fluxo salivar desenhou um estudo onde definiu intervalos de valores para quantificar o fluxo salivar da sua população, assim, segundo o autor valores entre 1,0 – 3,0 ml/min é considerada uma taxa normal, entre 0,7 – 1,0 ml/min é visto como uma fluxo salivar baixo e, por fim, abaixo de 0,7ml/min é considerado hipossalivação (65). De acordo com esta perspectiva, ambos os grupos apresentam taxas de fluxo salivar coerentes com o estudo de Dutra et al. o que permite afirmar, por conseguinte, que o volume salivar de ambas as populações é normal. Por outro lado, não é possível verificar diferenças estatisticamente significativas entre a população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico, o que não é consistente com o estudo de Vanishree et al. (2017) (62), uma vez que neste estudo foram analisadas as alterações orais decorrentes do tratamento ortodôntico, concluindo que há um aumento significativo do fluxo salivar na população portadora de aparelho ortodôntico (62). No entanto, comparando os valores obtidos com o estudo de Ribeiro et al. (2010) (66), há uma consistência dos resultados uma vez que em ambos não houve diferença estatística nos valores de volume e fluxo salivar para a população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico (66).

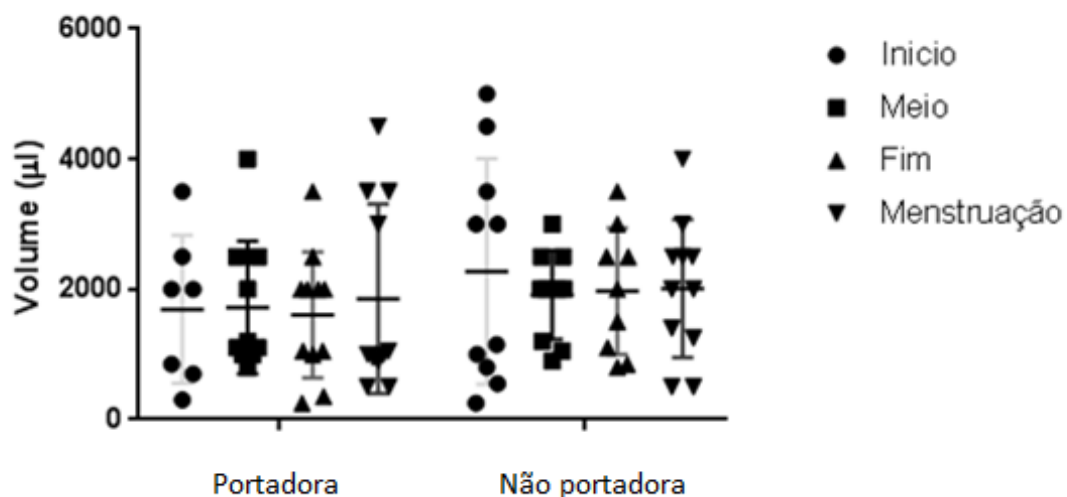


Figura 10 - Comparação do Volume de Saliva nas duas populações em estudo em cada fase do ciclo.

Tabela 4 – Fluxo Salivar na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico.

Situação	Fluxo salivar (média ± desvio padrão)
População total	942,20 ± 575,22 µl/min
População portadora aparelho ortodôntico	936,33 ± 578,84 µl/min
População não portadora de aparelho ortodôntico	941,99 ± 565,20 µl/min

Tabela 5 – Fluxo salivar ao longo do ciclo hormonal.

Situação	Fluxo salivar (média ± desvio padrão)
População no início do ciclo	881,14 ± 550,82 µl/min
População no meio do ciclo	942,72 ± 565,20 µl/min
População no fim do ciclo	997,30 ± 578,84 µl/min
População na menstruação	910,62 ± 564,81 µl/min

## 2. Análise do perfil total de proteínas – SalivaPrint

De acordo com a literatura há evidência suficiente para considerar que as mulheres que fazem terapia contraceptiva combinada, bem como os portadores de aparelho ortodôntico experienciam alterações na saúde oral. Primeiro devido à presença de recetores para estrogénio e progesterona nos tecidos orais, o que os torna um tecido-alvo à ação destas hormonas. O aumento das concentrações das hormonas esteroides nos tecidos orais promovem um microambiente adequado ao desenvolvimento de microrganismos patogénicos (21,22). A combinação de ambas as hormonas presentes nos contraceptivos orais combinados resulta num efeito catabólico, promovido pela progesterona, o que potencialmente diminui a resposta imunitária do hospedeiro. Este quadro é potenciado nos indivíduos portadores de aparelho ortodôntico, uma vez que é estabelecido a dificuldade acrescida durante a higienização, surgindo uma maior tendência à acumulação de placa bacteriana (9,15,17). Todavia, por se tratar de uma população estudante de Medicina Dentária e pelos conhecimentos sobre a importância da higiene oral, principalmente em casos

de tratamento ortodôntico, não foram encontradas variações na quantidade de placa bacteriana quando comparadas ambas as populações.

Sabendo alguns dos mecanismos já conhecidos como desregulados em indivíduos portadores de aparelho ortodôntico e em terapia contraceptiva combinada, quais serão as proteínas que regulam esses processos biológicos? (5,16,17,20,27,28,30,67) Será que existem diferentes mecanismos desregulados ao longo das fases do ciclo hormonal? Será que existem proteínas diferentemente expressas na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico?

Para dar respostas a estas perguntas e a outras mais específicas foi necessário utilizar a eletroforese capilar para estabelecer se os perfis de proteínas variam nas quatro fases analisadas do ciclo hormonal e em portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.

Após a análise dos perfis individuais foram identificados os perfis atípicos, isto é, aqueles que apresentam morfologias diferentes do padrão e que tivessem quantidades de proteínas totais reduzidas. Estas características denotam uma degradação das amostras correspondentes a esses perfis selecionados como atípicos. Neste sentido, procedeu-se a uma seleção das amostras com qualidade para a determinação do Perfil Médio, utilizando o algoritmo SalivaPrint Toolkit (40).

Na figura 11 e 12 são apresentados a título de exemplo os resultados para a situação de início do ciclo hormonal na população portadora de aparelho ortodôntico. Assim antes da seleção (figura 11) eram 13 os indivíduos em estudo e após a seleção (figura 12) apenas o perfil de 7 cumpriram os requisitos estabelecidos.

Este estudo foi aplicado a todos os perfis totais individuais selecionados, e os resultados são apresentados em Apêndice.

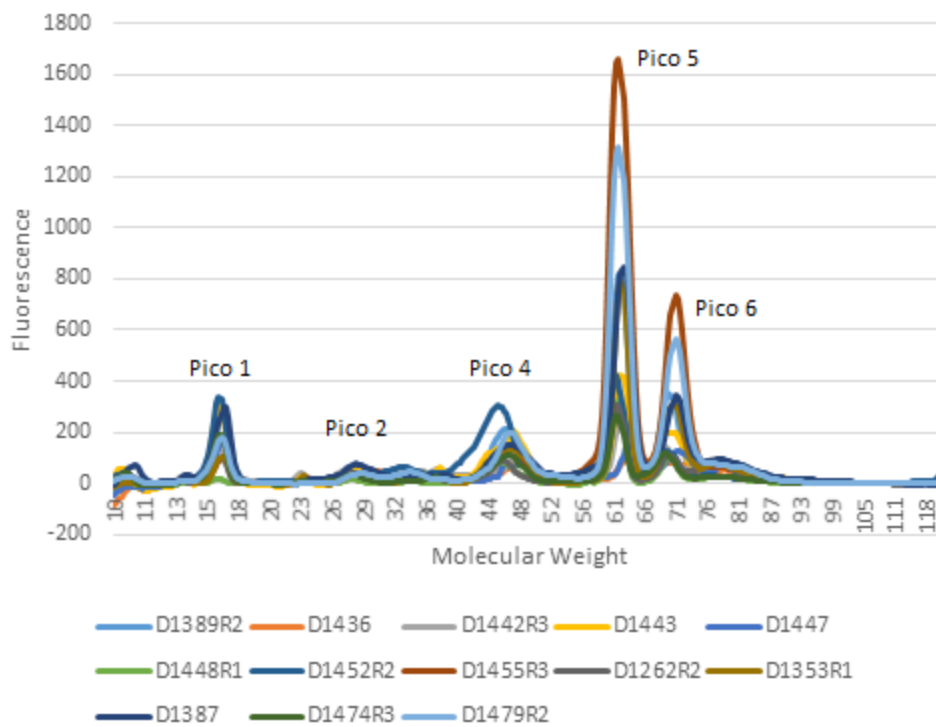


Figura 11 - Perfis de proteínas na fase início do ciclo hormonal em mulheres portadoras de aparelho ortodôntico.

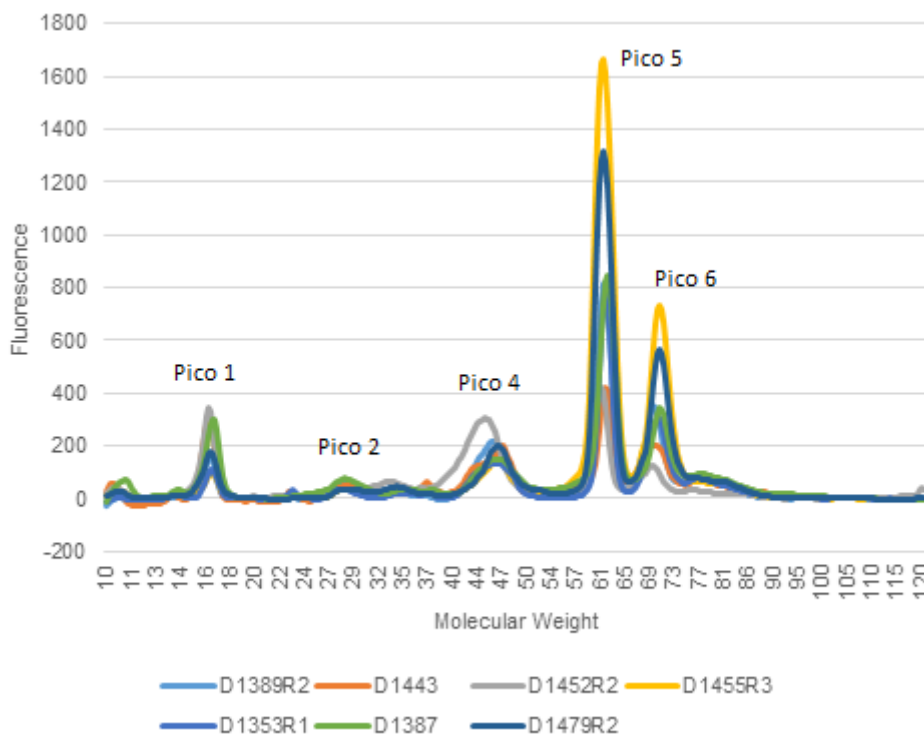


Figura 12 - Perfis de proteínas na fase início do ciclo hormonal em mulheres portadoras de aparelho ortodôntico após aplicação dos critérios de seleção.

De forma a perceber se há um SalivaPrint para cada fase do ciclo hormonal e se é influenciado pela presença de aparelho ortodôntico, procedeu-se à determinação Perfis Médios correspondentes a cada uma das situações em estudo. A partir dos Perfis Médios determinaram-se os 4 Perfis Diferença, correspondentes às fases do ciclo hormonal analisadas, correspondendo cada um deles à diferença entre o Perfil Médio em portadoras de aparelho ortodôntico com o Perfil Médio de não portadoras de aparelho ortodôntico.

A figura 13 apresenta o Perfil Médio para a população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico durante a fase do início do ciclo hormonal. É notória a diferença entre ambos os perfis, sendo que a população portadora de aparelho ortodôntico apresenta para 4 dos picos principais uma maior fluorescência, compatível com um aumento do número de proteínas, ou em alternativa uma maior diversidade de proteínas presentes nas gamas de massas moleculares correspondentes a cada pico. Adicionalmente no pico 5 e 6 nota-se uma deslocação para a direita (correspondendo a diferentes gamas de massas moleculares- MW) no perfil correspondente à população não portadora de aparelho ortodôntico, o que permite concluir que existem proteínas diferentes a estarem presentes na saliva na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico.

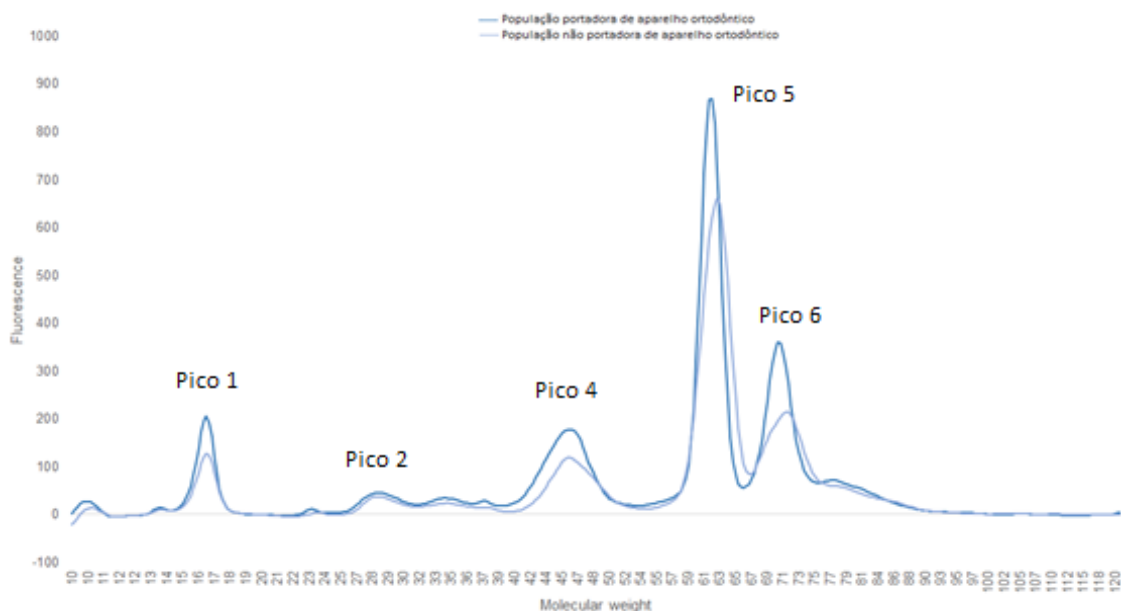


Figura 13 - Perfil Médio na fase início do ciclo hormonal de mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.

Na figura 14 são apresentados os Perfis Médios na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico para a fase do meio do ciclo hormonal. É visível a diferença entre a fluorescência das proteínas de ambos os perfis, todavia, nesta fase do ciclo o perfil médio com proteínas de maior fluorescência é o correspondente à população não portadora de aparelho ortodôntico. Há um notório aumento na quantidade de proteínas nos picos 5 e 6, sendo correspondentes à população não portadora de aparelho ortodôntico. Não há, no entanto, alteração das gamas de massas moleculares correspondentes a cada pico com exceção do pico 5 (60Kda).

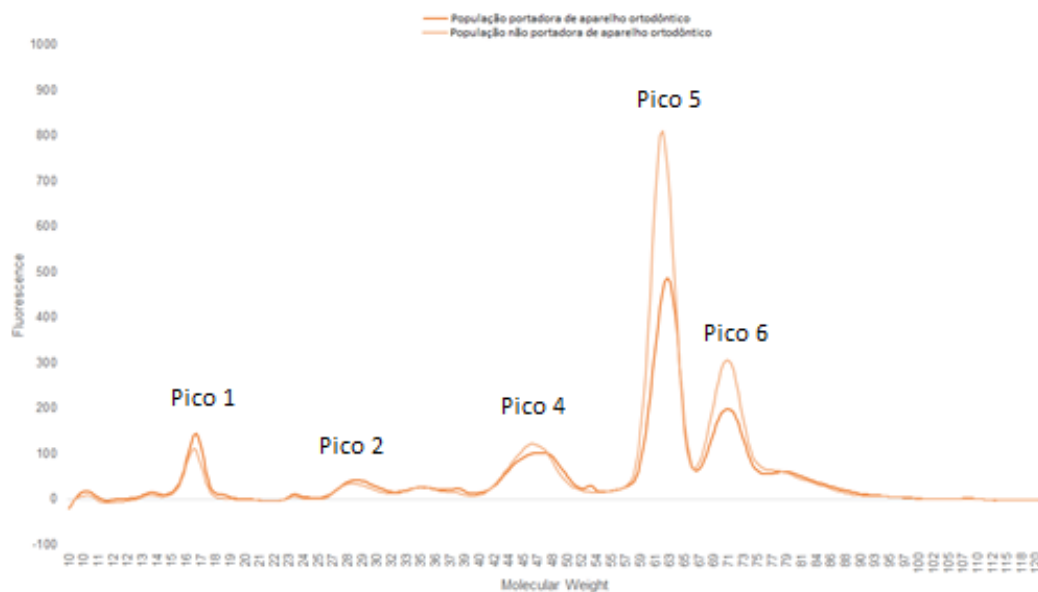


Figura 14 - Perfis Médios na fase meio do ciclo hormonal de mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.

Na figura 15 observa-se o perfil médio da população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico durante a fase do fim do ciclo hormonal. Para o pico 1 e 4 é visível a sobreposição dos perfis de ambas as populações, portanto sem alteração da gama de massas moleculares (MW), no entanto existe uma maior quantidade de fluorescência no perfil da população portadora de aparelho ortodôntico, correspondente a uma maior quantidade de proteínas presentes. No entanto, nos picos 5 e 6 a situação é invertida, observando-se maior quantidade de fluorescência de proteínas para a situação da população não portadora de aparelho ortodôntico. Ou seja, também nesta fase do ciclo a presença de aparelho ortodôntico tem implicação na expressão de proteínas presentes.

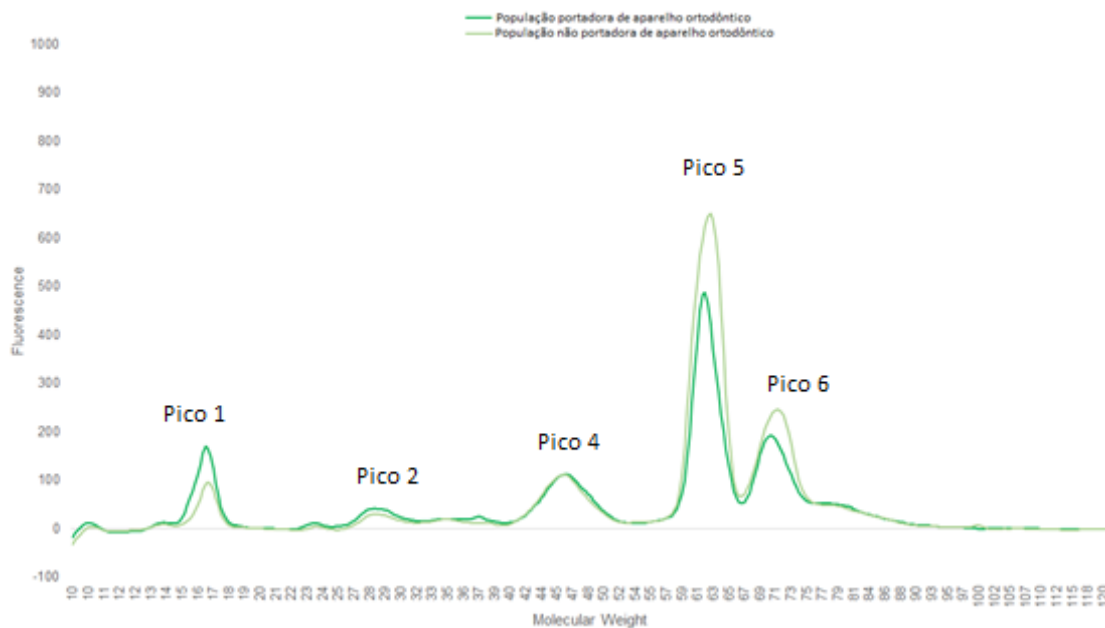


Figura 15 - Perfis Médios na fase fim do ciclo hormonal de mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.

Na figura 16 observa-se o Perfil Médio na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico durante a fase da menstruação. Não é tão evidente a diferença entre perfis como verificado nas fases analisadas anteriormente, todavia, no pico 5 e 6 é notória essa alteração, sendo resultado de um deslocamento para a esquerda do perfil médio da população portadora de aparelho ortodôntico, abarcando por consequência gamas de massas moleculares distintas e por consequência correspondendo a diferenças proteínas expressas.

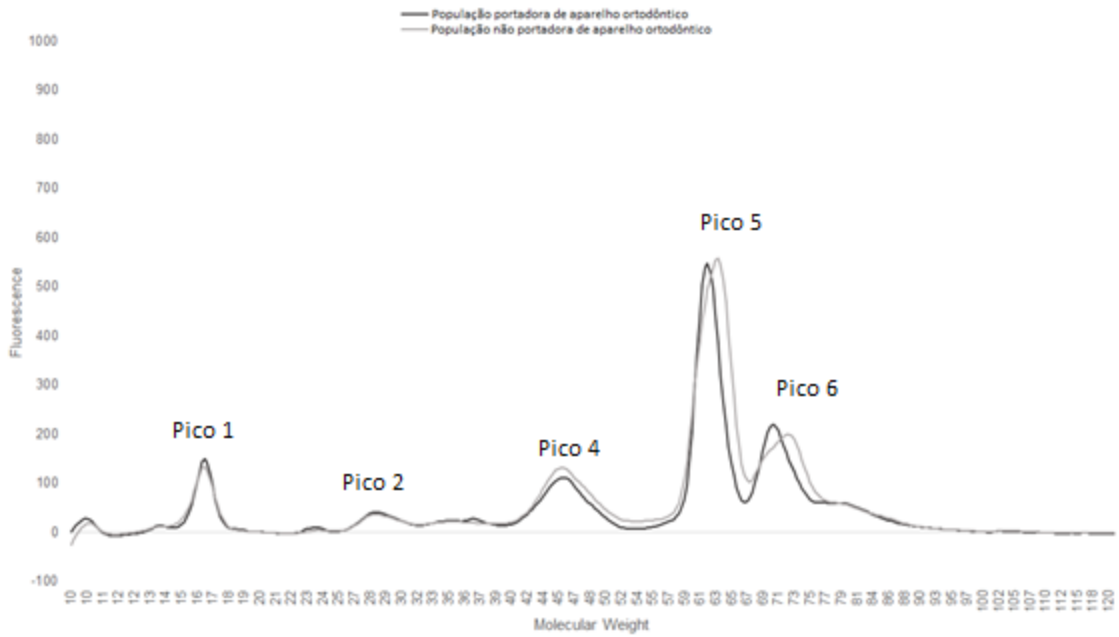


Figura 16 - Perfis Médios na fase da menstruação do ciclo em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico.

Através da interseção de todos os perfis médios para a população portadora (figura 17) e não portadora (figura 18) de aparelho ortodôntico, foi possível demonstrar que existe diferença de expressão de proteínas ao longo das fases do ciclo hormonal e que esta é influenciada pela presença de aparelho ortodôntico.

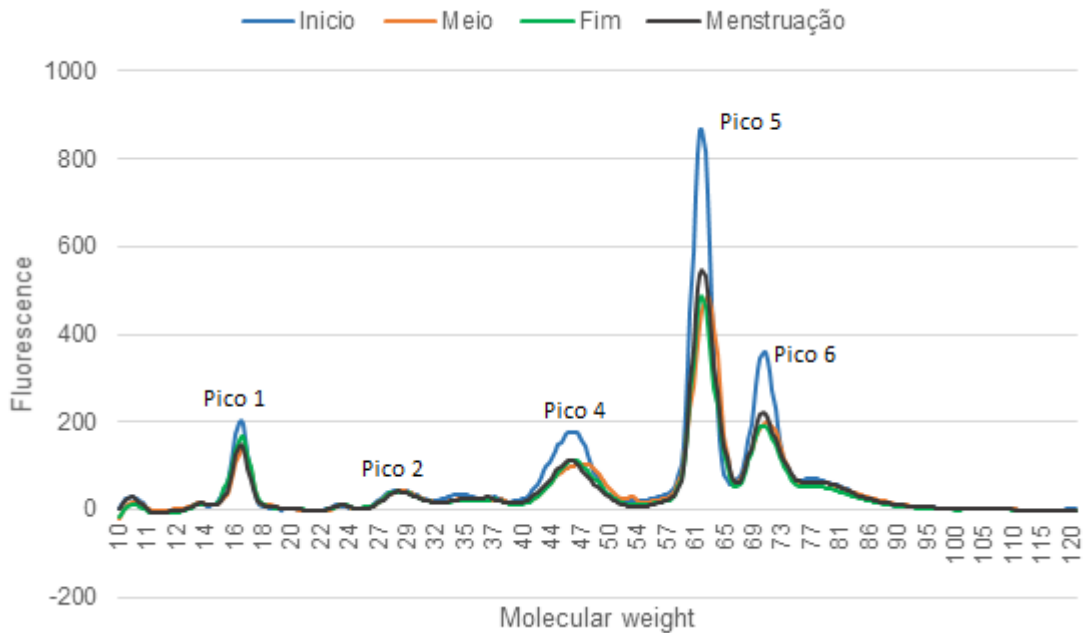


Figura 17 – Perfil médio de todas as fases do ciclo hormonal na população portadora de aparelho ortodôntico.

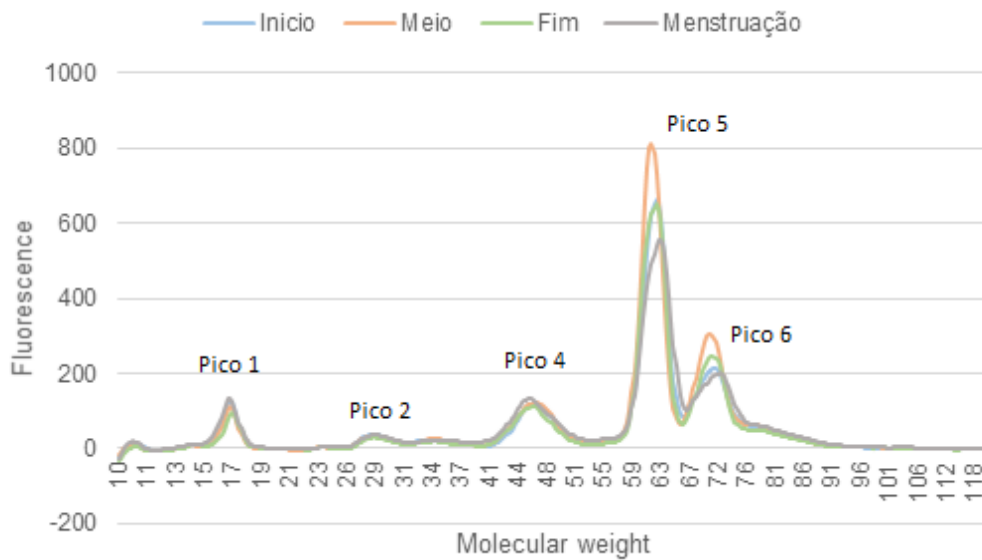


Figura 18 - Perfil médio de todas as fases do ciclo hormonal na população não portadora de aparelho ortodôntico.

Com os perfis médios traçados correspondentes a cada fase do ciclo para cada população é possível fazer a sua sobreposição, usando o algoritmo do SalivaPrint Toolkit para traçar um Perfil Diferença (figura 19) para cada fase do ciclo, podendo-se identificar de forma mais inteligível as diferenças na expressão de proteínas decorrentes de ter ou não aparelho ortodôntico.

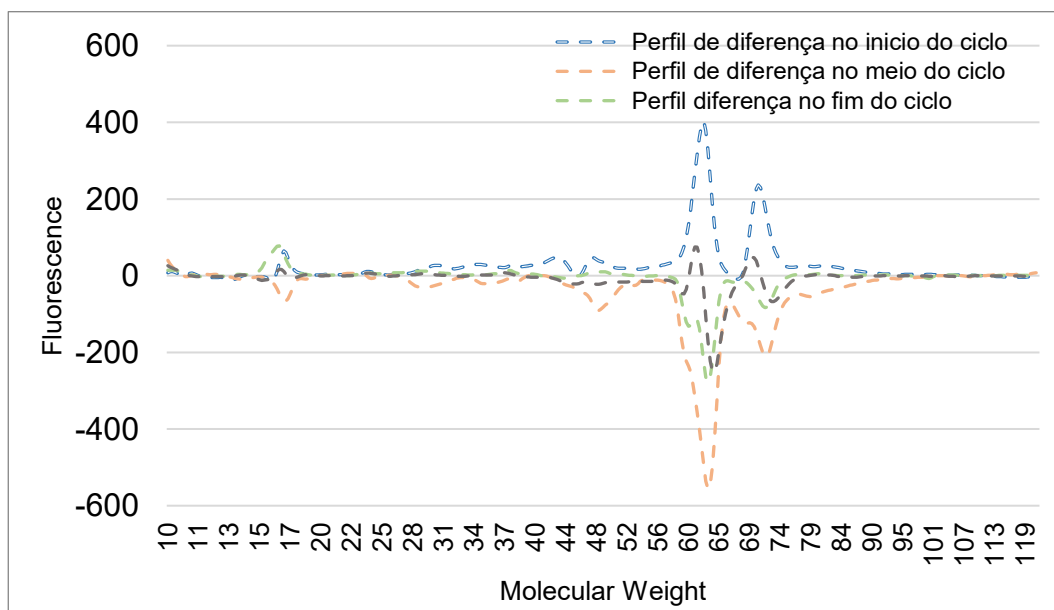


Figura 19 – Perfil diferença entre os perfis médios de todas as fases do ciclo hormonal da população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico.

Uma vez estabelecidos os Perfis Médios é possível determinar quais são as potenciais proteínas que mais contribuem para as diferenças de morfologia encontradas para cada uma das situações em estudo: fases do ciclo hormonal na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico. Conseguindo-se responder à questão problema: “Haverá proteínas diferentemente expressas em cada fase do ciclo hormonal?” “Será que a presença de aparelho ortodôntico induz alterações na expressão de proteínas ao longo do ciclo?” “Será possível identificar proteínas relacionadas com a resposta imune derivada da presença do aparelho ortodôntico?”

Neste sentido, a partir dos perfis médios obtidos de cada fase do ciclo hormonal para a população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico foram demarcadas as áreas que se encontravam na  $\frac{1}{2}$  altura superior de cada pico. Essa área corresponde ao intervalo de massas moleculares correspondente às proteínas que se encontram mais alteradas. Esta análise foi efetuada para cada pico de todos os perfis médios obtidos. A esta informação foi ainda adicionada o valor de massa molecular (MW) correspondente ao topo de cada pico (valor mais elevado de fluorescência) e que corresponde a(s) proteína(s) que mais contribuem para a diferença de intensidade/ morfologia do pico. Esta estratégia foi aplicada a todos os picos de todos os perfis médios traçados e a informação correspondente está organizada na tabela 6.

respetivo número de proteínas, correspondentes às proteínas portadoras e não portadoras de aparelo ortodômico.

Ciclo Menstrual	Peak Number	Average Profile Com Orto				Average Profile Sem Orto					
		Peak MW	Nº total de proteínas	Nº total de proteínas exclusivas	Top MW	Top FI	Peak MW	Nº total de proteínas	Nº total de proteínas exclusivas	Top MW	Top FI
Início	Peak 1	15,8 - 16,9	70	0	16,4	205,5	16,8 - 17	76	0	16,4	108,6
	Peak 2	26,9 - 30,9	173	12	28,5	45,3	27,1 - 30,5	146	0	28,3	38,0
	Peak 4	43 - 48,2	196	0	46,0	178,1	43,8 - 49	185	0	46,0	120,0
	Peak 5	60,3 - 63,2	75	0	61,9	868,8	60,6 - 64,2	88	0	62,5	660,5
	Peak 6	68,4 - 72,2	69	0	70,1	360,1	67,8 - 73,9	120	0	71,1	213,8
	Peak 1	15,9 - 17	71	0	16,6	144,8	15,8 - 16,9	70	0	16,4	111,5
Meio	Peak 2	27,1 - 30,9	161	0	28,8	41,7	27,1 - 30,5	146	0	28,3	34,5
	Peak 4	43 - 49,9	246	36	47,6	101,7	43,3 - 49	198	0	46,3	121,8
	Peak 5	60,6 - 64,2	88	13	62,5	487,3	60,3 - 63,5	79	0	61,9	810,7
	Peak 6	68,1 - 73,2	93	0	70,8	199,0	68,1 - 72,8	87	0	70,8	306,5
	Peak 1	15,8 - 17	76	0	16,4	168,8	15,9 - 17	71	0	16,6	95,8
	Peak 2	27,1 - 30,7	153	0	28,3	40,9	27,3 - 30,7	150	0	28,5	29,2
Fim	Peak 4	43,6 - 49	189	0	46,0	111,6	43,3 - 48,5	193	0	46,0	111,3
	Peak 5	60,3 - 63,5	79	0	61,9	486,9	60,3 - 64,2	91	0	62,5	650,3
	Peak 6	68,1 - 73,2	93	0	70,1	191,6	68,1 - 73,2	93	0	71,1	245,9
	Peak 1	15,8 - 16,9	70	0	16,4	150,0	15,8 - 17	76	0	16,4	133,4
	Peak 2	27,1 - 30,7	153	0	28,5	41,4	27,1 - 31,2	170	17	28,5	36,4
	Peak 4	43 - 48,5	205	0	45,7	111,4	43 - 49	210	12	45,4	132,1
Menstruação	Peak 5	60,3 - 63,5	79	0	61,9	547,0	60,3 - 64,8	103	11	63,2	557,6
	Peak 6	68,1 - 73,2	93	0	70,1	220,1	67,1 - 74,9	145	25	72,2	200,4

Tendo informação sobre as massas moleculares é possível identificar quais as proteínas encontradas. Utilizando a base de dados SalivaTecDB é possível a partir dos valores de massa molecular (a qual é conhecida para cada proteína), determinar as proteínas presentes em cada pico que correspondem a um determinado intervalo de massas moleculares). A tabela 6 apresenta para cada intervalo de massas o número total de proteínas presentes. Listando as proteínas (depois de identificadas pelo SalivaTecDB) e utilizando estratégias como as utilizadas pelo diagrama de Venny onde é possível identificar as proteínas que só se expressam numa determinada fase do ciclo hormonal e se essas proteínas exclusivas variam na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico.

Uma vez identificadas as proteínas exclusivas de cada fase do ciclo hormonal na população portadora e não portadora de aparelho ortodôntico é possível identificar os mecanismos moleculares em que elas participam usando para o efeito ferramentas bioinformáticas. Determinados os mecanismos em que participam podemos saber quais os que estão alterados em cada fase do ciclo e se são diferentemente influenciados pela presença/ ausência do aparelho ortodôntico.

No pico 2 para a população portadora de aparelho ortodôntico, foram encontradas 12 proteínas exclusivas (figura 21, tabela 7), isto é, que só surgem na fase do início do ciclo hormonal, não sendo comuns com mais nenhuma fase. A tabela 8 lista as 12 proteínas exclusivas, mostrando que estas estão relacionadas com vários mecanismos biológicos de regulação e adesão biológica, processos celulares e processos do sistema imunitário. Em relação às vias a que estas proteínas estão associadas existem processos de angiogénese e vias de sinalização de VEGF. O VEGF é um potente estimulador do aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e da angiogénese. A família do VEGF é considerado o fator angiogénico mais importante e potente (68).

Na figura 20 estão descritas as proteínas envolvidas em vários processos incluindo pressão arterial, coagulação e descamação de epitélios, podendo também proteger contra cardiopatias. A *kallikrein- 4* (KLK-4) assume um papel essencial na formação do esmalte, amelogénese. A formação do esmalte dentário ocorre por fases, sendo que inicialmente há a produção das proteínas que constituem o esmalte (*amelogenin*, *ameloblastine* e *enamelin*), denominando-se por fase secretora. Em seguida há a transição desta fase para a de maturação, onde as proteínas são

removidas para possibilitar a expansão dos cristais de hidroxiapatita mais facilmente, assim o esmalte torna-se com a dureza e aspeto característico. É na fase de transição e maturação que as KLK-4 são expressas, clivando as proteínas da matriz do esmalte antes de serem removidas da camada de esmalte já madura e endurecida. No entanto, pode haver mutações no gene que codifica a KLK-4 e criar fenótipos de malformações no esmalte, conhecidas clinicamente como amelogenese imperfeita (69).

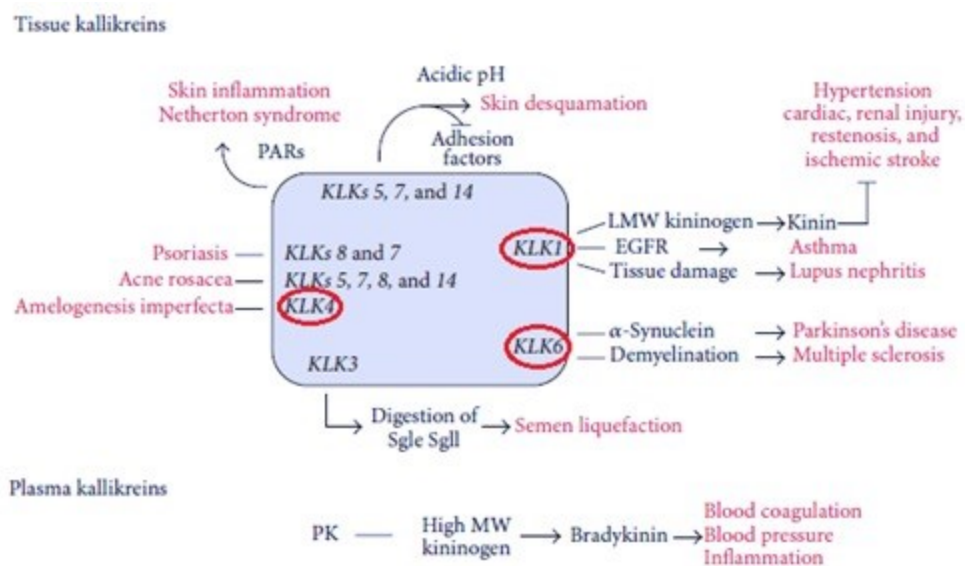


Figura 20 - Kallikrein e suas funções. Adaptado de Stefanini et al. (70)

Michael et al. (2017) (71) afirmam que o esmalte com fluorose deve-se a este estar hipomineralizado, em parte. Uma vez que houve um atraso na remoção das proteínas da matriz do esmalte, impossibilitando o crescimento/expansão final dos cristais da hidroxiapatita. Atualmente, sabe-se que a transcrição da KLK-4, bem como dos outros subtipos de *Kallikrein*, é regulado por hormonas esteroides, por isso no estudo de Michael et al. (2017) (71) os autores procuraram determinar a possibilidade do ião flúor regular negativamente a expressão da KLK-4. Concluíram que, de facto, o ião flúor está relacionado com a regulação negativa da KLK-4 o que favorece o fenótipo de hipomineralização do esmalte, comum nos quadros clínicos de fluorose dentária (71).

Por outro lado, as *kallikrein* surgem não só como sendo reguladas pela progesterona e estrogénios, mas também como moduladores da expressão das mesmas. No estudo de Bhoola, Dorey & Jones (1974) (72) realizado em ratos, é referido que os níveis de *kallikrein* diminuíram quando foi realizada uma ovariectomia e repostos durante o tratamento com hormonas esteroides. Neste sentido, foi concluído no mesmo estudo que a concentração de *kallikrein* varia conforme as oscilações das hormonas esteroides durante o ciclo hormonal (72).

Tendo em conta que os níveis de *kallikrein* dependem proporcionalmente das oscilações das hormonas esteroides é possível inferir que durante a terapia hormonal contraceptiva, onde os níveis das hormonas se encontram estabilizados, haverá uma maior produção de *kallikrein* e, por conseguinte, um maior risco de tromboembolismo (26–28,73,74).

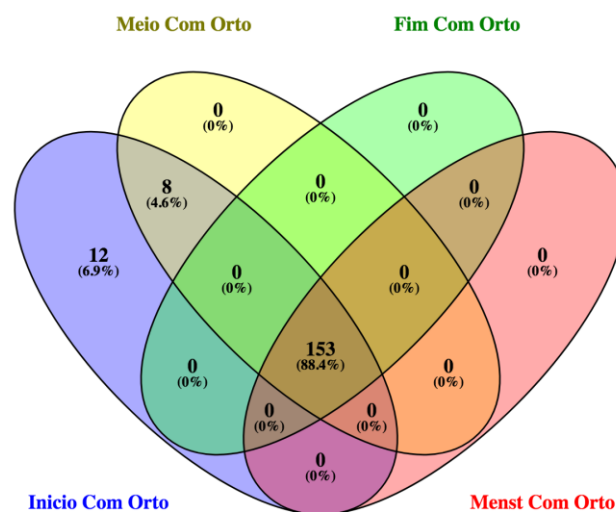


Figura 21 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 2 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico.

Tabela 7 – Identificação das 12 proteínas exclusivas da fase do início do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico.

Q92 876	Kallikrein-6 (EC 3.4.21.-) (Neurosin) (Protease M) (SP59) (Serine protease 18) (Serine protease 9) (Zyme)
P20 160	Azurocidin (Cationic antimicrobial protein CAP37) (Heparin-binding protein) (HBP) (hHBP)
Q2Q D09	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (Fragment)
B0YJ C5	Vimentin (Vimentin variant 4)
Q86 V81	THO complex subunit 4 (Tho4) (Ally of AML-1 and LEF-1) (Aly/REF export factor) (Transcriptional coactivator Aly/REF) (bZIP-enhancing factor BEF)
O00 299	Chloride intracellular channel protein 1 (Chloride channel ABP) (Nuclear chloride ion channel 27) (NCC27) (Regulatory nuclear chloride ion channel protein) (hRNCC)
Q9N VX0	HAUS augmin-like complex subunit 2 (Centrosomal protein of 27 kDa) (Cep27)
Q6U WN 5	Ly6/PLAUR domain-containing protein 5
Q9B XJ4	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 (Collagenous repeat-containing sequence 26 kDa protein) (CORS26) (Secretory protein CORS26)
P15 692	Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (Vascular permeability factor) (VPF)
Q96 DR5	BPI fold-containing family A member 2 (Parotid secretory protein) (PSP) (Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2)
Q9Y 5K2	Kallikrein-4 (EC 3.4.21.-) (Enamel matrix serine proteinase 1) (Kallikrein-like protein 1) (KLK-L1) (Prostase) (Serine protease 17)

No pico 4, para a população portadora de aparelho ortodôntico, foram encontradas 36 proteínas exclusivas (figura 22, tabela 8) do meio do ciclo hormonal, as quais regulam mecanismos como a biogênese de componentes de organização celular, processos celulares e metabólicos, assim como processos da resposta imunitária. Estas proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo hormonal intervêm em vias para a ativação dos linfócitos B, regulação do citoesqueleto, vias de sinalização mediada pelo recetor da dopamina, via de sinalização da hormona gonadotrofina e da ubiquitina implicadas em mecanismos de apoptose.

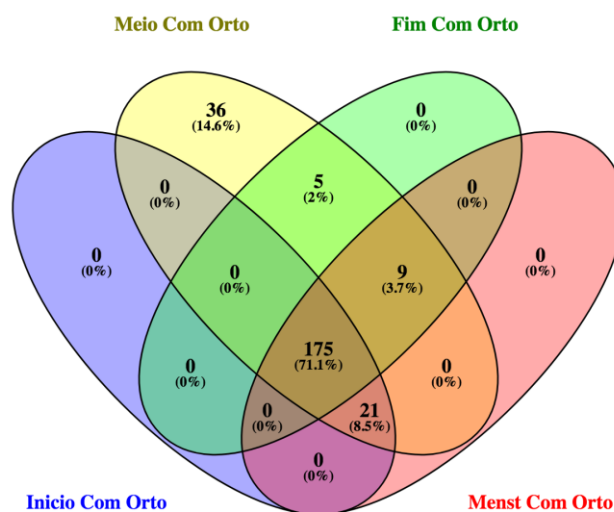


Figura 22 – Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 4 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico.

Tabela 8 - Identificação das 36 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico.

P19012	Keratin, type I cytoskeletal 15 (Cytokeratin-15) (CK-15) (Keratin-15) (K15)
P55010	Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF-5)
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H) [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-terminally processed]
Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 (Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1) (BPI-like 1) (Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2) (RYSR)
P17980	26S proteasome regulatory subunit 6A (26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT5) (Proteasome 26S subunit ATPase 3) (Proteasome subunit P50) (Tat-binding protein 1) (TBP-1)
P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (hnRNP H2) (FTP-3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H') (hnRNP H') [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2, N-terminally processed]
P21728	D(1A) dopamine receptor (Dopamine D1 receptor)
Q9NP62	Chorion-specific transcription factor GCMa (hGCMa) (GCM motif protein 1) (Glial cells missing homolog 1)
Q71ME5	Voltage-gated potassium channel subunit Kv6.4
O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B (EC 3.6.4.6) (Cell migration-inducing gene 1 protein) (Suppressor of K(+) transport growth defect 1) (Protein SKD1)

Q7Z3Z0	Keratin, type I cytoskeletal 25 (Cytokeratin-25) (CK-25) (Keratin-25) (K25) (Keratin-25A) (K25A) (Type I inner root sheath-specific keratin-K25irs1)
Q6ZNI0	Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein <span style="float: right;">beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 7 (EC 2.4.1.-)</span>
Q53XC6	Full-length cDNA clone CS0DI011YN22 of Placenta of Homo sapiens (human) (Legumain, isoform CRA_a) (cDNA FLJ78453, highly similar to Homo sapiens legumain (LGMN), transcript variant 2, mRNA)
P01871	Immunoglobulin heavy constant mu (Ig mu chain C region) (Ig mu chain C region BOT) (Ig mu chain C region GAL) (Ig mu chain C region OU)
Q99538	Legumain (EC 3.4.22.34) (Asparaginyl endopeptidase) (Protease, cysteine 1)
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial (EF-Tu) (P43)
P04350	Tubulin beta-4A chain (Tubulin 5 beta) (Tubulin beta-4 chain)
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13 (Cytokeratin-13) (CK-13) (Keratin-13) (K13)
Q08AI8	Uncharacterized protein C2orf54
Q7Z6R9	Transcription factor AP-2-delta (AP2-delta) (Activating enhancer-binding protein 2-delta) (Transcription factor AP-2-beta-like 1)
B4DQ92	cDNA FLJ59379, highly similar to Hematopoietic lineage cell-specific protein
P07437	Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain)
B0YJC4	Vimentin (Vimentin variant 3)
Q8NFK5	BPI fold-containing family B member 6 (Bactericidal/permeability-increasing protein-like 3)
Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain (Tubulin beta 8 class VIII)
P49593	Protein phosphatase 1F (EC 3.1.3.16) (Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase) (CaM-kinase phosphatase) (CaMKPase) (Partner of PIX 2) (Protein fem-2 homolog) (hFem-2)
P68371	Tubulin beta-4B chain (Tubulin beta-2 chain) (Tubulin beta-2C chain)
Q7Z3Y8	Keratin, type I cytoskeletal 27 (Cytokeratin-27) (CK-27) (Keratin-25C) (K25C) (Keratin-27) (K27) (Type I inner root sheath-specific keratin-K25irs3)
Q13885	Tubulin beta-2A chain (Tubulin beta class IIa)
P68366	Tubulin alpha-4A chain (Alpha-tubulin 1) (Testis-specific alpha-tubulin) (Tubulin H2-alpha) (Tubulin alpha-1 chain)
Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)
P14136	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain (Alpha-tubulin 6) (Tubulin alpha-6 chain) [Cleaved into: Detyrosinated tubulin alpha-1C chain]
B4DNK4	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)
Q8WY64	E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP (EC 2.3.2.27) (Inducible degrader of the LDL-receptor) (Idol) (Myosin regulatory light chain interacting protein) (MIR) (RING-type E3 ubiquitin transferase MYLIP)
B2RBL3	Thymidine phosphorylase (TP) (EC 2.4.2.4) (TdRPase)

Para a fase do meio do ciclo hormonal foram encontradas 13 proteínas exclusivas (figura 23, tabela 9) desta fase, identificadas no pico 5. Estas proteínas estão relacionadas, também com processos de organização de componentes, adesão e

regulação biológica, processos do sistema imunitário e reprodução e intervêm nas vias de sinalização da integrina e no metabolismo do ácido pirúvico relacionado com as necessidades de metabolismos dos açúcares.

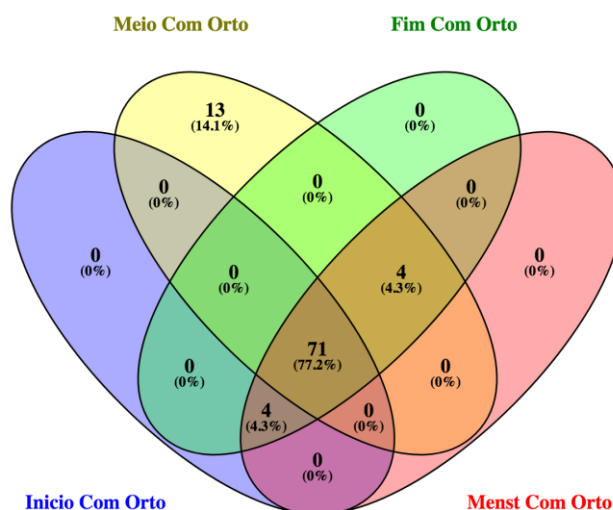


Figura 23 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 5 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico.

Tabela 9 - Identificação das 13 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico. A amarelo estão destacadas as proteínas nos principais mecanismos moleculares relacionados com a fisiologia do ciclo hormonal.

Q14050	Collagen alpha-3(IX) chain
Q8N130	Sodium-dependent phosphate transport protein 2C (Sodium-phosphate transport protein 2C) (Na(+)-dependent phosphate cotransporter 2C) (Sodium/inorganic phosphate cotransporter IIC) (Sodium/phosphate cotransporter 2C) (Na(+)/Pi cotransporter 2C) (NaPi-2c) (Solute carrier family 34 member 3)
Q96S53	Dual specificity testis-specific protein kinase 2 (EC 2.7.12.1) (Testicular protein kinase 2)
P28908	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 8 (CD30L receptor) (Ki-1 antigen) (Lymphocyte activation antigen CD30) (CD antigen CD30)
Q86UE4	Protein LYRIC (3D3/LYRIC) (Astrocyte elevated gene-1 protein) (AEG-1) (Lysine-rich CEACAM1 co-isolated protein) (Metadherin) (Metastasis adhesion protein)
Q9NRR5	Ubiquilin-4 (Ataxin-1 interacting ubiquitin-like protein) (A1Up) (Ataxin-1 ubiquitin-like-interacting protein A1U) (Connexin43-interacting protein of 75 kDa) (CIP75)
Q96HC4	PDZ and LIM domain protein 5 (Enigma homolog) (Enigma-like PDZ and LIM domains protein)

Q9BW04	Specifically androgen-regulated gene protein
P36406	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM23 (EC 2.3.2.27) (ADP-ribosylation factor domain-containing protein 1) (GTP-binding protein ARD-1) (RING finger protein 46) (RING-type E3 ubiquitin transferase TRIM23) (Tripartite motif-containing protein 23)
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L)
Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein (hKPRP)
P48163	NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME) (EC 1.1.1.40) (Malic enzyme 1)
Q96AY3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10 (PPIase FKBP10) (EC 5.2.1.8) (65 kDa FK506-binding protein) (65 kDa FKBP) (FKBP-65) (FK506-binding protein 10) (FKBP-10) (Immunophilin FKBP65) (Rotamase)

Para o pico 2, na população não portadora de aparelho ortodôntico, foram identificadas 17 proteínas exclusivas (figura 24, tabela 10) da fase da menstruação. Estas proteínas regulam processos de regulação biológica, processos celulares, resposta a estímulos, biogénese, processos metabólicos e de desenvolvimento. No caso da proteína *FGF- Fibroblast growth factor* (P09038) apresenta-se com grande relevância na ferramenta PANTHER. Também vias para a angiogénese, glicólise, metabolismo das purinas e proliferação e diferenciação celular foram identificadas. Além deste mecanismos serem concordantes com a fisiologia da fase da menstruação, esta proteína tem uma grande relevância nos domínios clínicos e cirúrgico, pois possuem um papel fundamental na cicatrização de tecidos.

Neste pico foram encontradas, novamente, *kallikrein-11* tendo esta proteína sido relacionada com doença de Sjorgen e vários géneros de cancro.

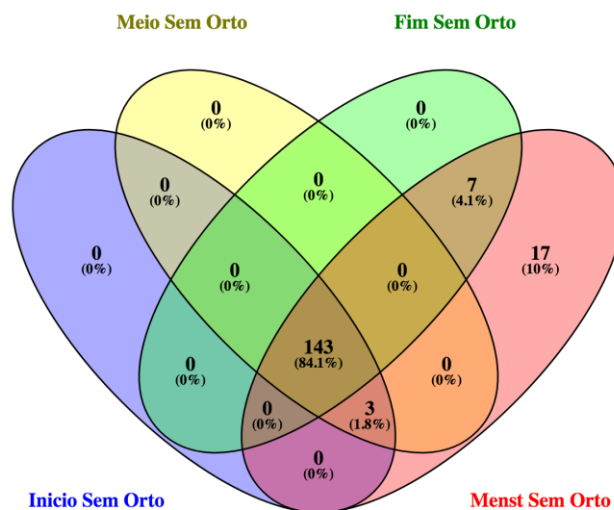


Figura 24 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 2 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico.

Tabela 10 - Identificação das 17 proteínas exclusivas da fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico. A rosa estão destacadas as proteínas nos principais mecanismos moleculares relacionados com a fisiologia do ciclo hormonal.

P09038	Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) (Basic fibroblast growth factor) (bFGF) (Heparin-binding growth factor 2) (HBGF-2)
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1) (hVDAC1) (Outer mitochondrial membrane protein porin 1) (Plasmalemmal porin) (Porin 31HL) (Porin 31HM)
P02647	Apolipoprotein A-I (Apo-AI) (ApoA-I) (Apolipoprotein A1) [Cleaved into: Proapolipoprotein A-I (ProapoA-I); Truncated apolipoprotein A-I (Apolipoprotein A-I(1-242))]
P60174	Triosephosphate isomerase (TIM) (EC 5.3.1.1) (Triose-phosphate isomerase)
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 (hnRNP A0)
Q6ZVX7	F-box only protein 50 (NCC receptor protein 1 homolog) (NCCRP-1) (Non-specific cytotoxic cell receptor protein 1 homolog)
P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (EC 1.6.5.2) (Azoreductase) (DT-diaphorase) (DTD) (Menadione reductase) (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1) (Phylloquinone reductase) (Quinone reductase 1) (QR1)
O75828	Carbonyl reductase [NADPH] 3 (EC 1.1.1.184) (NADPH-dependent carbonyl reductase 3) (Short chain dehydrogenase/reductase family 21C member 2)
Q04118	Basic salivary proline-rich protein 3 (Parotid salivary glycoprotein G1) (Proline-rich protein G1)
P29692	Elongation factor 1-delta (EF-1-delta) (Antigen NY-CO-4)

Q9UBX7	Kallikrein-11 (hK11) (EC 3.4.21.-) (Hippostasin) (Serine protease 20) (Trypsin-like protease) [Cleaved into: Kallikrein-11 inactive chain 1; Kallikrein-11 inactive chain 2]
B3KSA0	cDNA FLJ35812 fis, clone TESTI2006051, highly similar to Acyl-coenzyme A thioesterase 1 (EC 3.1.2.2)
Q8N7E6	cDNA FLJ25727 fis, clone TST05479
Q9Y275	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B (B lymphocyte stimulator) (BLyS) (B-cell-activating factor) (BAFF) (Dendritic cell-derived TNF-like molecule) (TNF-and APOL-related leukocyte expressed ligand 1) (TALL-1) (CD antigen CD257) [Cleaved into: Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13b, membrane form; Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13b, soluble form]
Q8N7K7	cDNA FLJ40941 fis, clone UTERU2008426
Q16094	Calnexin (Fragment)
Q13126	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase (EC 2.4.2.28) (5'-methylthioadenosine phosphorylase) (MTA phosphorylase) (MTAP) (MTAPase)

Para o pico 4, para a população não portadora de aparelho hormonal, foram também identificadas 12 proteínas exclusivas (figura 25, tabela 11) da fase da menstruação. Mais uma vez, estas proteínas encontram-se integradas em processos de desenvolvimento e do metabolismo, bem como processos do sistema imune. Estas proteínas integram vias para a angiogénese, vias de sinalização para a GnRH e para a integrina, novamente notório no pico 4 tal como no 2, vias de sinalização para o *Fibroblast growth factor (FGF)*.

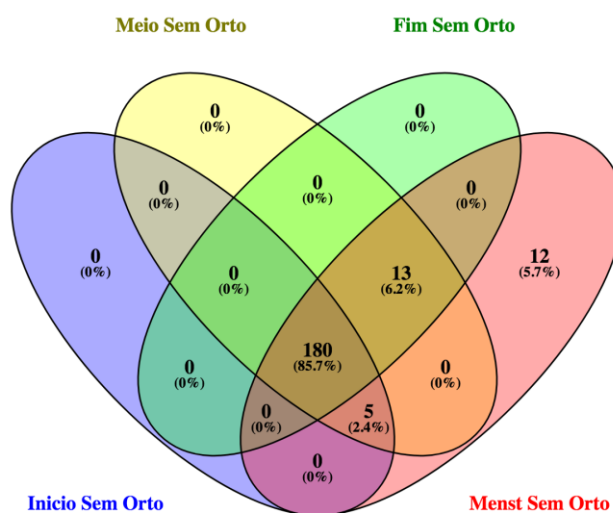


Figura 25 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 4 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico

Tabela 11 - Identificação das 12 proteínas exclusivas da fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico. A rosa estão destacadas as proteínas nos principais mecanismos moleculares relacionados com a fisiologia do ciclo hormonal.

P12035	Keratin, type II cytoskeletal 3 (65 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-3) (CK-3) (Keratin-3) (K3) (Type-II keratin Kb3)
Q9H8W5	Tripartite motif-containing protein 45 (RING finger protein 99)
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (FHR-5)
P49023	Paxillin
Q53H57	Carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1.-) (Fragment)
Q86U44	N6-adenosine-methyltransferase catalytic subunit (EC 2.1.1.62) (Methyltransferase-like protein 3) (hMETTL3) (N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit) (MT-A70)
Q13114	TNF receptor-associated factor 3 (EC 2.3.2.27) (CAP-1) (CD40 receptor-associated factor 1) (CRAF1) (CD40-binding protein) (CD40BP) (LMP1-associated protein 1) (LAP1) (RING-type E3 ubiquitin transferase TRAF3)
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Cleaved into: Bifunctional purine biosynthesis protein PURH, N-terminally processed] [Includes: Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3) (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase) (AICAR transformylase); IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) (ATIC) (IMP synthase) (Inosinicase)]
Q10471	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (EC 2.4.1.41) (Polypeptide GalNAc transferase 2) (GalNAc-T2) (pp-GaNTase 2) (Protein-UDP acetylgalactosaminyltransferase 2) (UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2) [Cleaved into: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 soluble form]
Q96RR4	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaM-KK 2) (CaM-kinase kinase 2) (CaMKK 2) (EC 2.7.11.17) (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta) (CaM-KK beta) (CaM-kinase kinase beta) (CaMKK beta)
Q9NSB2	Keratin, type II cuticular Hb4 (Keratin-84) (K84) (Type II hair keratin Hb4) (Type-II keratin Kb24)

Para o pico 5, na população não portadora de aparelho ortodôntico, foram identificadas 11 proteínas (figura 26, tabela 12) diferentemente expressas na fase da menstruação comparativamente às outras fases. Estas proteínas estão relacionadas com processos de desenvolvimento, metabolismo e do sistema imunitário. Surgem associadas a vias de sinalização da hormona gonadotrofina, do fator de crescimento do fibroblasto e via para a angiogénese. A GnRH desempenha um papel importante no ciclo hormonal, uma vez que controla o crescimento folicular, a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo. A GnRH é responsável pela síntese e libertação de FSH e LH, sendo este processo regulado pela frequência e amplitude dos pulsos da GnRH.

Esta hormona foi identificada como exclusiva da fase da menstruação nesta população pois é suportado pela bibliografia que durante a fase da menstruação há uma descida das hormonas FSH e LH o que provoca, no hipotálamo, um feedback positivo para a síntese de GnRH de forma a equilibrar, novamente, a concentração sérica de FSH e LH, para dar origem a um novo ciclo (75).

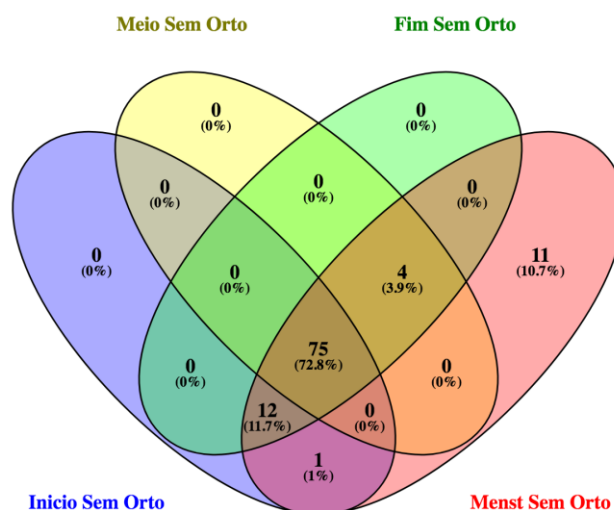


Figura 26 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 5 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico.

Tabela 12 - Identificação das 11 proteínas exclusivas da fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico. A rosa estão destacadas as proteínas nos principais mecanismos moleculares relacionados com a fisiologia do ciclo hormonal.

P12035	Keratin, type II cytoskeletal 3 (65 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-3) (CK-3) (Keratin-3) (K3) (Type-II keratin Kb3)
Q9H8W5	Tripartite motif-containing protein 45 (RING finger protein 99)
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (FHR-5)
P49023	Paxillin
Q53H57	Carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1.-) (Fragment)
Q86U44	N6-adenosine-methyltransferase catalytic subunit (EC 2.1.1.62) (Methyltransferase-like protein 3) (hMETTL3) (N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit) (MT-A70)
Q13114	TNF receptor-associated factor 3 (EC 2.3.2.27) (CAP-1) (CD40 receptor-associated factor 1) (CRAF1) (CD40-binding protein) (CD40BP) (LMP1-associated protein 1) (LAP1) (RING-type E3 ubiquitin transferase TRAF3)

P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Cleaved into: Bifunctional purine biosynthesis protein PURH, N-terminally processed] [Includes: Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3) (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase) (AICAR transformylase); IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) (ATIC) (IMP synthase) (Inosinicase)]
Q10471	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (EC 2.4.1.41) (Polypeptide GalNAc transferase 2) (GalNAc-T2) (pp-GaNTase 2) (Protein-UDP acetylgalactosaminyltransferase 2) (UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2) [Cleaved into: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 soluble form]
Q96RR4	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaM-KK 2) (CaM-kinase kinase 2) (CaMKK 2) (EC 2.7.11.17) (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta) (CaM-KK beta) (CaM-kinase kinase beta) (CaMKK beta)
Q9NSB2	Keratin, type II cuticular Hb4 (Keratin-84) (K84) (Type II hair keratin Hb4) (Type-II keratin Kb24)

No pico 6, para a população não portadora de aparelho ortodôntico, foram identificadas 25 proteínas (figura 27, tabela 13) diferentemente expressas na fase da menstruação. Há vários mecanismos biológicos em que estas proteínas intervêm tais como a angiogênese, vias de sinalização para a apoptose, ativação dos linfócitos B, inflamação mediada por quimiocinas e citocinas, via de sinalização do interferon gama, via para a cascata de sinalização da GnRH e *Transforming growth factor*.

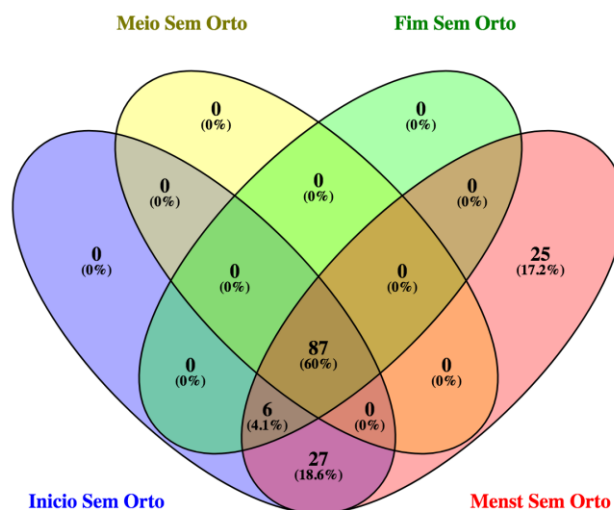


Figura 27 - Diagrama de Venny mostrando o nº de proteínas do pico 6 que se expressam em cada uma das fases do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico.

Tabela 13 - Identificação das 25 proteínas exclusivas da fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico. A rosa estão destacadas as proteínas nos principais mecanismos moleculares relacionados com a fisiologia do ciclo hormonal.

Q9Y483	Metal-response element-binding transcription factor 2 (Metal regulatory transcription factor 2) (Metal-response element DNA-binding protein M96) (Polycomb-like protein 2) (hPCI2)
P32456	Guanylate-binding protein 2 (EC 3.6.5.-) (GTP-binding protein 2) (GBP-2) (HuGBP-2) (Guanine nucleotide-binding protein 2) (Interferon-induced guanylate-binding protein 2)
Q9BWM5	Zinc finger protein 416
P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1 (2'-5'-oligoadenylate-binding protein) (HuHP68) (RNase L inhibitor) (Ribonuclease 4 inhibitor) (RNS4I)
P50895	Basal cell adhesion molecule (Auberger B antigen) (B-CAM cell surface glycoprotein) (F8/G253 antigen) (Lutheran antigen) (Lutheran blood group glycoprotein) (CD antigen CD239)
Q15300	RET tyrosine kinase/cAMP protein kinase A subunit RI
P29350	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (EC 3.1.3.48) (Hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase) (Protein-tyrosine phosphatase 1C) (PTP-1C) (Protein-tyrosine phosphatase SHP-1) (SH-PTP1)
P27824	Calnexin (IP90) (Major histocompatibility complex class I antigen-binding protein p88) (p90)
Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1 (FBP) (FUSE-binding protein 1) (DNA helicase V) (hDH V)
Q8TDN4	CDK5 and ABL1 enzyme substrate 1 (Interactor with CDK3 1) (Ik3-1)
P15923	Transcription factor E2-alpha (Class B basic helix-loop-helix protein 21) (bHLHb21) (Immunoglobulin enhancer-binding factor E12/E47) (Immunoglobulin transcription factor 1) (Kappa-E2-binding factor) (Transcription factor 3) (TCF-3) (Transcription factor ITF-1)
P02545	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C (70 kDa lamin) (Renal carcinoma antigen NY-REN-32)]
Q9UM07	Protein-arginine deiminase type-4 (EC 3.5.3.15) (HL-60 PAD) (Peptidylarginine deiminase IV) (Protein-arginine deiminase type IV)
Q14166	Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12
Q15067	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (AOX) (EC 1.3.3.6) (Palmitoyl-CoA oxidase) (Straight-chain acyl-CoA oxidase) (SCOX)
Q86T29	Zinc finger protein 605
Q6P9A3	Zinc finger protein 549
Q12934	Filensin (Beaded filament structural protein 1) (Lens fiber cell beaded-filament structural protein CP 115) (CP115) (Lens intermediate filament-like heavy) (LIFL-H)
P18850	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha (cAMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha) (Activating transcription factor 6 alpha) (ATF6-alpha) [Cleaved into: Processed cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha]
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (Beta ig-h3) (Kerato-epithelin) (RGD-containing collagen-associated protein) (RGD-CAP)

P08236	Beta-glucuronidase (EC 3.2.1.31) (Beta-G1)
Q9ULC6	Protein-arginine deiminase type-1 (EC 3.5.3.15) (Peptidylarginine deiminase I) (Protein-arginine deiminase type I)
P16050	Arachidonate 15-lipoxygenase (15-LOX) (15-LOX-1) (EC 1.13.11.33) (12/15-lipoxygenase) (Arachidonate 12-lipoxygenase, leukocyte-type) (12-LOX) (EC 1.13.11.31) (Arachidonate omega-6 lipoxygenase)
Q96N76	Urocanate hydratase (Urocanase) (EC 4.2.1.49) (Imidazolonepropionate hydrolase)
Q8TDF6	RAS guanyl-releasing protein 4

Na tabela 6, estão representados os 5 picos analisados existentes nos perfis médios de cada fase do ciclo hormonal. Foi novamente utilizada a mesma estratégia, ou seja, para cada pico foram demarcadas as áreas que se encontravam na  $\frac{1}{2}$  altura superior. Essa área corresponde ao intervalo de massas moleculares que se encontra mais alterada. Esta análise foi efetuada para cada pico de todos os perfis médios obtidos. Tendo informação sobre as massas moleculares é possível identificar quais as proteínas encontradas. Utilizando a base de dados SalivaTecDB é possível a partir dos valores de massa molecular (a qual é conhecida para cada proteína), determinar as proteínas presentes em cada pico que correspondem a um determinado intervalo de massas moleculares). Na tabela 14, estão listados os números totais de proteínas identificadas em cada pico por fase do ciclo hormonal, permitindo identificar as proteínas exclusivas que representam os mecanismos alterados em portadores de aparelho ortodôntico.

Posteriormente, utilizando-se estratégias bioinformáticas é possível identificar as proteínas que só se expressam numa determinada fase do ciclo hormonal, obtendo-se o número total de proteínas exclusivas descritas na tabela 14.

Tabela 14 – Número total de proteínas e de proteínas exclusivas identificadas em cada pico, correspondentes às fases do ciclo hormonal, e que caracterizam as diferenças de expressão de proteínas existente entre a população portadora ou não portadora de aparelho ortodôntico.

Nº de Pico	Fase do ciclo Hormonal	Nº total de proteínas no pico	Nº total de proteínas exclusivas
Pico 1	Início	76	0
	Meio	71	0
	Fim	76	0
	Menstruação	76	0
Pico 2	Início	173	12
	Meio	161	0
	Fim	153	0
	Menstruação	170	9
Pico 4	Início	196	0
	Meio	246	36
	Fim	193	0
	Menstruação	210	0
Pico 5	Início	88	0
	Meio	88	0
	Fim	91	0
	Menstruação	103	11
Pico 6	Início	120	0
	Meio	93	0
	Fim	93	0
	Menstruação	145	25

Na figura 29 estão identificadas as proteínas exclusivas da fase do início do ciclo hormonal para o pico 2. Tal como verificado na tabela 15, foram identificadas 12 proteínas que só se expressam nesta fase do ciclo e estão presentes no pico 2. Destas destacam-se a *Kallikrein-4*, *Kallikrein-6*, *Azurocidin* e Sistema de Complemento (C1) (*Complement C1*) que estão relacionadas com mecanismos moleculares que ocorrem no início do ciclo hormonal.

As proteínas da família da *Kallikrein* são um subgrupo de proteinases de serina que participam em processos proteolíticos e controlo dos níveis de proteínas na fisiologia normal e em situações patológicas. O sistema Kallikrein/kinin (KKS) tem sido descrito como um importante mediador de processos fisiológicos, incluindo a participação no processo inflamatório em muitos tecidos, vasodilatação, ativação e inativação de proteases, estimulação da síntese de prostaglandinas e

contratibilidade da musculatura lisa. A inflamação é uma resposta do organismo às agressões, envolvendo vários mecanismos biológicos relacionados entre si e altamente regulados, tais como: fibrinólise, ativação do sistema do complemento, auto oxidação e regulação hormonal. Fisiologicamente, os sistemas do complemento e da coagulação compartilham componentes. A ativação do fator XII da coagulação é controlada pela mesma proteína reguladora da ativação do sistema do complemento, inibidor de C1. A deficiência do inibidor de C1 leva a uma patologia conhecida como angioedema hereditário. Todavia, uma manifestação clínica similar ao angioedema tem sido descrita em mulheres que usam contraceptivos orais combinados, principalmente derivado do estrogênio. Esta influência do estrogênio na coagulação e no sistema do complemento também é evidenciada pela ação regulatória do estrogênio sobre a expressão do fator XII e dos seus níveis plasmáticos (76,77).

O sistema Kallikrein/kinin e a cascata de coagulação são processos moleculares que integram diversas proteínas que regulam a coagulação sanguínea. A formação de trombina inicia-se pelo complexo fator VII/ Fator tecidual, ativando o fator IX e X, o que leva à conversão da protrombina em trombina, pelo fator X ativado. A trombina produzida converte o fator XI na sua forma ativada, o que sustenta a produção de trombina devido à ativação do fator IX. Embora o fator XII não seja utilizado, na cascata de coagulação, para a ativação do fator XI durante a síntese de trombina; no sistema Kallikrein/kinin, há a autoativação do fator XII, convertendo a *pré- Kallikrein* em *Kallikrein*, ativando o fator XII adicional. A *Kallikrein* vai também clivar o *kininogen*, libertando *bradikinin*. Neste sentido, o sistema Kallikrein/kinin pode promover a síntese de trombina através da regulação do fator XII, mediado pelo fator XI. Por outro lado, há evidência que o fator XI pode ativar o fator XII. O fator XI pode atuar como uma ponte bidirecional, permitindo que o sistema Kallikrein/kinin e a cascata de coagulação se influenciem mutuamente (figura 28) (78,79).

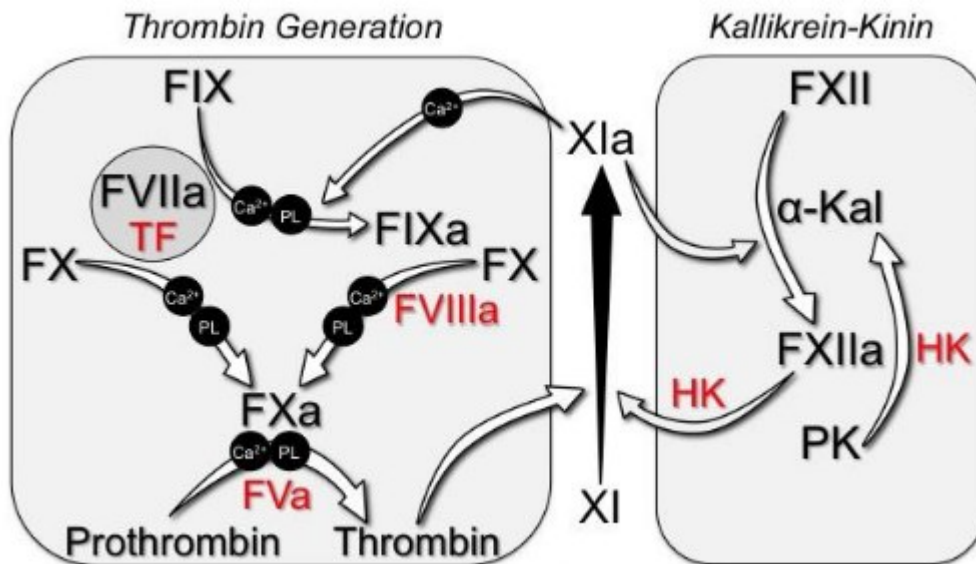


Figura 28 - Influência bidirecional do sistema Kallikrein/kinin e da cascata de coagulação(79).

A azurocidina apresenta semelhanças na sequência de aminoácidos com as proteínases de serina, no entanto, não possui atividade proteolítica, mas sim atividade antibiótica, devido a uma mutação ocorrida. É uma proteína produzida por macrófagos e neutrófilos que tem um efeito especial sobre bactérias gram-negativas. A viabilidade de bactérias como a *E. coli* é comprometida pelo aumento da permeabilidade da membrana por ação desta proteinase, o que leva a uma maior suscetibilidade do microrganismo ao efeito de outras enzimas capazes de degradar o peptidoglicano e o fosfolípido da membrana (80).

Os mecanismos moleculares característicos da fase do início do ciclo hormonal da mulher estão implicados na proliferação e migração de células do epitélio, estando inerente a este processo a adesão das novas células do epitélio endométrico (adesão focal, célula-matriz extracelular) e a vascularização dos novos tecidos (angiogénese). Esta fase é consequente à fase da menstruação, caracterizada pela descamação e expulsão de grande parte do epitélio de endométrio, sendo por consequência necessário uma reconstrução do epitélio do endométrio.

Estas evidências estão mais notórias na população portadora de aparelho ortodôntico, tal como se verifica na figura 29, no pico 2.

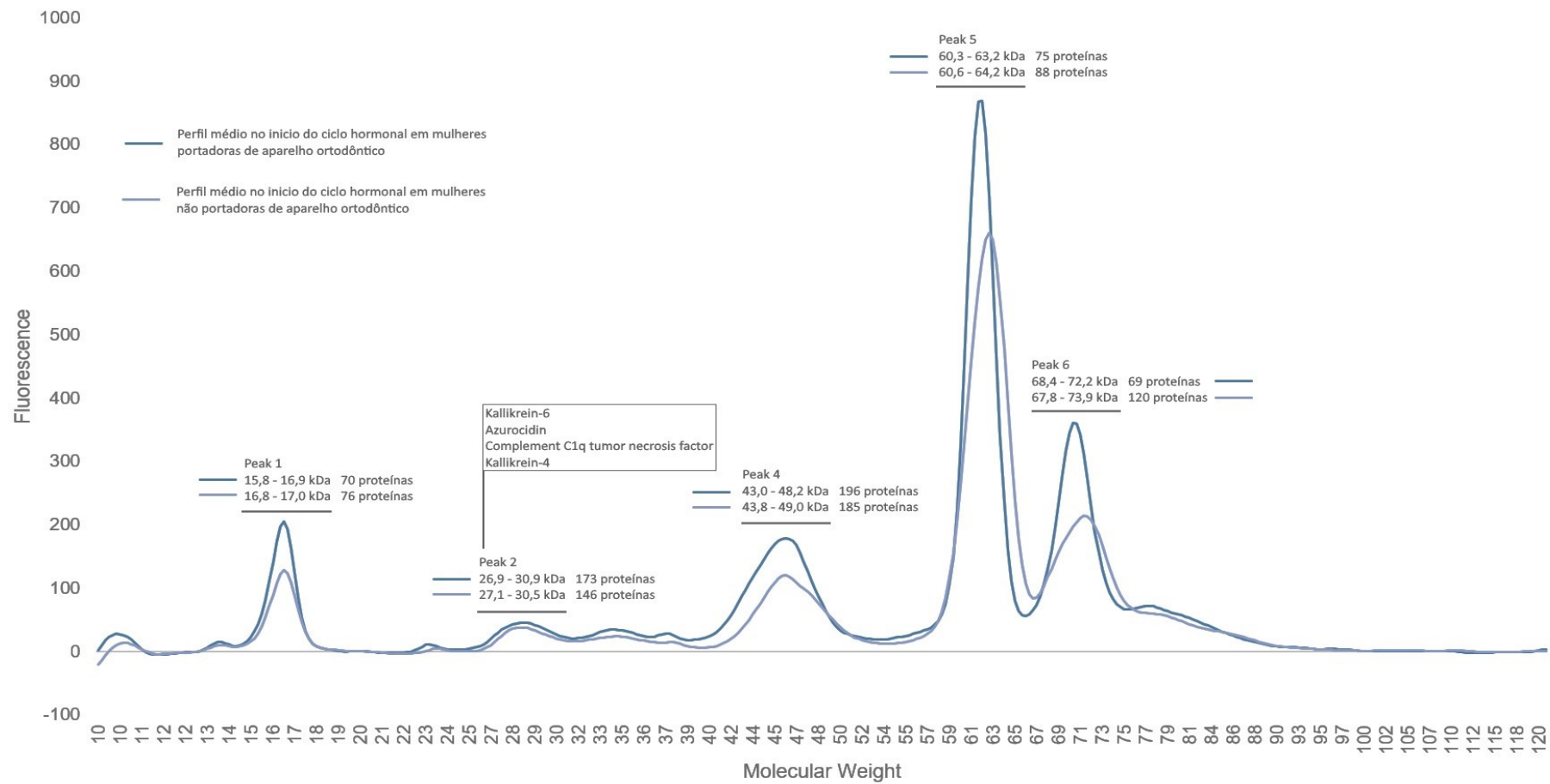


Figura 29 - Perfil médio da fase do início do ciclo hormonal em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico. Apresentação do intervalo de massas moleculares e do número total das proteínas identificadas em cada pico. No pico 2, são descritas as proteínas que contribuem para as diferenças que ocorrem nesta fase do ciclo hormonal.

Tabela 15 - Identificação das 12 proteínas exclusivas da fase do início do ciclo hormonal.

Q92876	Kallikrein-6 (EC 3.4.21.-) (Neurosin) (Protease M) (SP59) (Serine protease 18) (Serine protease 9) (Zyme)
P20160	Azurocidin (Cationic antimicrobial protein CAP37) (Heparin-binding protein) (HBP) (hHBP)
Q2QD09	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (Fragment)
B0YJC5	Vimentin (Vimentin variant 4)
Q86V81	THO complex subunit 4 (Tho4) (Ally of AML-1 and LEF-1) (Aly/REF export factor) (Transcriptional coactivator Aly/REF) (bZIP-enhancing factor BEF)
O00299	Chloride intracellular channel protein 1 (Chloride channel ABP) (Nuclear chloride ion channel 27) (NCC27) (Regulatory nuclear chloride ion channel protein) (hRNCC)
Q9NVX0	HAUS augmin-like complex subunit 2 (Centrosomal protein of 27 kDa) (Cep27)
Q6UWN5	Ly6/PLAUR domain-containing protein 5
Q9BXJ4	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 (Collagenous repeat-containing sequence 26 kDa protein) (CORS26) (Secretory protein CORS26)
P15692	Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (Vascular permeability factor) (VPF)
Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2 (Parotid secretory protein) (PSP) (Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2)
Q9Y5K2	Kallikrein-4 (EC 3.4.21.-) (Enamel matrix serine proteinase 1) (Kallikrein-like protein 1) (KLK-L1) (Prostase) (Serine protease 17)

Na figura 30 estão identificadas 36 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo hormonal, (tabela 16). Das quais se descrevem-se 3 proteínas, uma vez que se encontram diretamente relacionadas com a fisiologia do ciclo hormonal da mulher. Neste sentido, a identificação da proteína *E3-Ubiquitina* permite afirmar que na fase do meio do ciclo são iniciados os mecanismos moleculares que levam à descamação do tecido epitelial. A *E3-Ubiquitina* encontra-se envolvida em diversos mecanismos celulares, tais como: regulação da progressão do ciclo celular, reparação do DNA, embriogénese, regulação da transcrição, indução da resposta inflamatória, apresentação do antigénio e apoptose. Sendo que se encontra presente em todas as células eucariotas e possui como função primordial a degradação de substratos proteicos (81–83).

Em relação às proteínas *BPI fold-containing family B member 6* e *BPI fold-containing family B member 2* encontram-se em grânulos de neutrófilos e de eosinófilos, ambas as proteínas ligam endotoxinas bacterianas e modulam a resposta do hospedeiro a infeções bacterianas gram-negativas. Estas proteínas são reconhecidas como bactericidas e são capazes também de aumentar a permeabilidade da membrana celular (84).

Na fase do meio do ciclo hormonal, estão identificados mecanismos, principalmente de comunicação entre células (*gap junctions*), resposta imunitária e descamação celular. Fisiologicamente, nesta fase do ciclo podem advir dois comportamentos esperados pelo epitélio do endométrio. Por uma lado, caso haja fecundação, o endométrio encontra-se preparado para a nidadação, visto na fase anterior ter sido alvo de migração e proliferação celular. No entanto, neste estudo é esperado não haver fecundação, visto a população estar em terapia hormonal contraceptiva combinada. Assim, não havendo fecundação as células epiteliais, através das conexinas, comunicam de forma a que todas as células do epitélio formem um conjunto funcional. Nesta fase começa, no entanto, a preparação dos mecanismos moleculares, nomeadamente com o aumento da concentração de ubiquitinas, a consequente degradação de proteínas tecidulares para que a descamação possa acontecer. Esta descamação tecidular vai suscetibilizar o epitélio, tornando a agressão por bactérias, tais como *E. coli*, mais facilitada. Neste sentido, surgem mecanismos de resposta imunitária para a defesa do hospedeiro.

Estas evidências estão mais notórias na população não portadora de aparelho ortodôntico, tal como se verifica na figura 30.

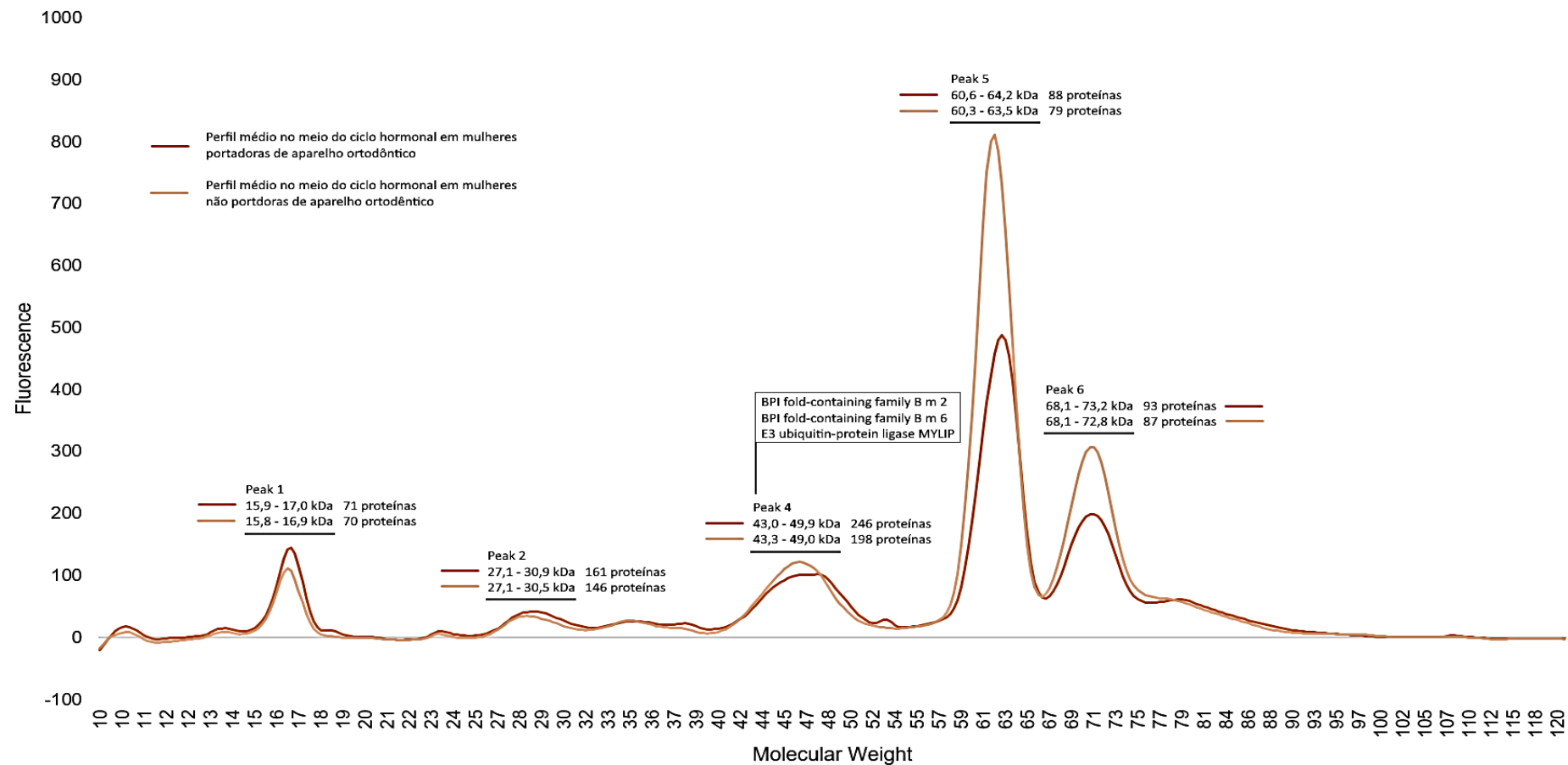


Figura 30 - Perfil médio da fase do meio do ciclo hormonal em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico. Apresentação do intervalo de massas moleculares e do número total das proteínas identificadas em cada pico. No pico 4, são identificadas as proteínas que caracterizam esta fase do ciclo hormonal.

Tabela 16 - Identificação das 36 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo hormonal. A amarelo estão destacadas as proteínas nos principais mecanismos moleculares relacionados com a fisiologia do ciclo hormonal.

P19012	Keratin, type I cytoskeletal 15 (Cytokeratin-15) (CK-15) (Keratin-15) (K15)
P55010	Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF-5)
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H) [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-terminally processed]
Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 (Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1) (BPI-like 1) (Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2) (RYSR)
P17980	26S proteasome regulatory subunit 6A (26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT5) (Proteasome 26S subunit ATPase 3) (Proteasome subunit P50) (Tat-binding protein 1) (TBP-1)
P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (hnRNP H2) (FTP-3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H') (hnRNP H') [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2, N-terminally processed]
P21728	D(1A) dopamine receptor (Dopamine D1 receptor)
Q9NP62	Chorion-specific transcription factor GCMa (hGCMa) (GCM motif protein 1) (Glial cells missing homolog 1)
Q71ME5	Voltage-gated potassium channel subunit Kv6.4
O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B (EC 3.6.4.6) (Cell migration-inducing gene 1 protein) (Suppressor of K(+) transport growth defect 1) (Protein SKD1)
Q7Z3Z0	Keratin, type I cytoskeletal 25 (Cytokeratin-25) (CK-25) (Keratin-25) (K25) (Keratin-25A) (K25A) (Type I inner root sheath-specific keratin-K25irs1)
Q6ZNI0	Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 7 (EC 2.4.1.-)
Q53XC6	Full-length cDNA clone CS0DI011YN22 of Placenta of Homo sapiens (human) (Legumain, isoform CRA_a) (cDNA FLJ78453, highly similar to Homo sapiens legumain (LGMN), transcript variant 2, mRNA)
P01871	Immunoglobulin heavy constant mu (Ig mu chain C region) (Ig mu chain C region BOT) (Ig mu chain C region GAL) (Ig mu chain C region OU)
Q99538	Legumain (EC 3.4.22.34) (Asparaginyl endopeptidase) (Protease, cysteine 1)
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial (EF-Tu) (P43)
P04350	Tubulin beta-4A chain (Tubulin 5 beta) (Tubulin beta-4 chain)
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13 (Cytokeratin-13) (CK-13) (Keratin-13) (K13)
Q08A18	Uncharacterized protein C2orf54
Q7Z6R9	Transcription factor AP-2-delta (AP2-delta) (Activating enhancer-binding protein 2-delta) (Transcription factor AP-2-beta-like 1)
B4DQ92	cDNA FLJ59379, highly similar to Hematopoietic lineage cell-specific protein
P07437	Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain)
B0YJC4	Vimentin (Vimentin variant 3)
Q8Nfq5	BPI fold-containing family B member 6 (Bactericidal/permeability-increasing protein-like 3)
Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain (Tubulin beta 8 class VIII)
P49593	Protein phosphatase 1F (EC 3.1.3.16) (Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase) (CaM-kinase phosphatase) (CaMKPase) (Partner of PIX 2) (Protein fem-2 homolog) (hFem-2)
P68371	Tubulin beta-4B chain (Tubulin beta-2 chain) (Tubulin beta-2C chain)
Q7Z3Y8	Keratin, type I cytoskeletal 27 (Cytokeratin-27) (CK-27) (Keratin-25C) (K25C) (Keratin-27) (K27) (Type I inner root sheath-specific keratin-K25irs3)

Q13885	Tubulin beta-2A chain (Tubulin beta class IIa)
P68366	Tubulin alpha-4A chain (Alpha-tubulin 1) (Testis-specific alpha-tubulin) (Tubulin H2-alpha) (Tubulin alpha-1 chain)
Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)
P14136	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain (Alpha-tubulin 6) (Tubulin alpha-6 chain) [Cleaved into: Detyrosinated tubulin alpha-1C chain]
B4DNK4	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)
Q8WY64	E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP (EC 2.3.2.27) (Inducible degrader of the LDL-receptor) (Idol) (Myosin regulatory light chain interacting protein) (MIR) (RING-type E3 ubiquitin transferase MYLIP)
B2RBL3	Thymidine phosphorylase (TP) (EC 2.4.2.4) (TdRPase)

Para a fase da menstruação foram identificadas 45 proteínas exclusivas (tabela 17), estando na figura 31 os conjuntos de proteínas dos picos 2, 5 e 6 já selecionadas de acordo com o seu eventual papel na fisiologia desta fase do ciclo hormonal.

A *Kallikrein-11* é secretada por células epiteliais, sendo localizada no complexo de Golgi. Tal como as restantes *Kallikrein*, a *Kallikrein-11* é, também, regulada positivamente pelas hormonas esteróides, especialmente o estrogénio(85).

O *Complement factor H-related protein 5* facilita a degradação de C3b pelo fator-I. Nesta fase há, principalmente devido a proteína C5, a desgranulação dos mastócitos e dos basófilos, aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. O *Tumor necrosis factor* foi uma das proteínas identificadas como exclusiva da fase da menstruação, é uma citocina capaz de induzir a apoptose de célula. É secretado principalmente pelos macrófagos, sendo produzido nomeadamente pela agressão de bactérias gram-negativas. Quando presente o *TNF* promove a vasodilatação e estimula a produção de quimiocinas por células da resposta imunitária, contribuindo para o estabelecimento de processo inflamatório local como mecanismo de defesa. No hipotálamo o *TNF* age como um pirógeno endógeno induzindo a febre, enquanto que no fígado vai estimular a produção das proteínas da fase aguda da resposta inflamatória (86). A proteína *Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3* (TGFBI) é um componente da matriz extracelular importante para a interação célula-colágeno. Esta proteína liga-se ao colagénio tipo I, II e IV, o que justifica a sua presença em muitas proteínas da matriz extracelular, as quais modulam a adesão celular, servindo como reconhecimento para várias integrinas (87).

Fisiologicamente, na fase da menstruação há a descamação tecidual e a consequente rotura de vasos sanguíneos. Estes mecanismos bem como a resposta imunitária contra a agressão de bactérias, são desenvolvidos a partir da fase do meio do ciclo, e têm vindo a progredir até à fase da menstruação. Nesta fase, há uma desagregação do epitélio do endométrio e a sua expulsão conjuntamente com hemorragia derivada da isquémia e consequente necrose e rotura dos vasos sanguíneos. O facto deste epitélio se encontrar sem a sua camada epitelial, torna-o vulnerável à agressão por bactérias. Neste sentido, há o recrutamento de células da resposta imunitária, tais como os leucócitos, *Tumor necrosis factor* e *Complement factor H*. Estes atravessam os vasos sanguíneos (diapedése), deslocando-se para os locais de infeção. A presença do *TNF* nesta fase do ciclo justifica o quadro febril de muitas jovens durante a fase da menstruação, especialmente no início da puberdade.

Estas evidências estão mais notórias na população não portadora de aparelho ortodôntico, tal como se verifica na figura 31, nos picos 2, 5 e 6.

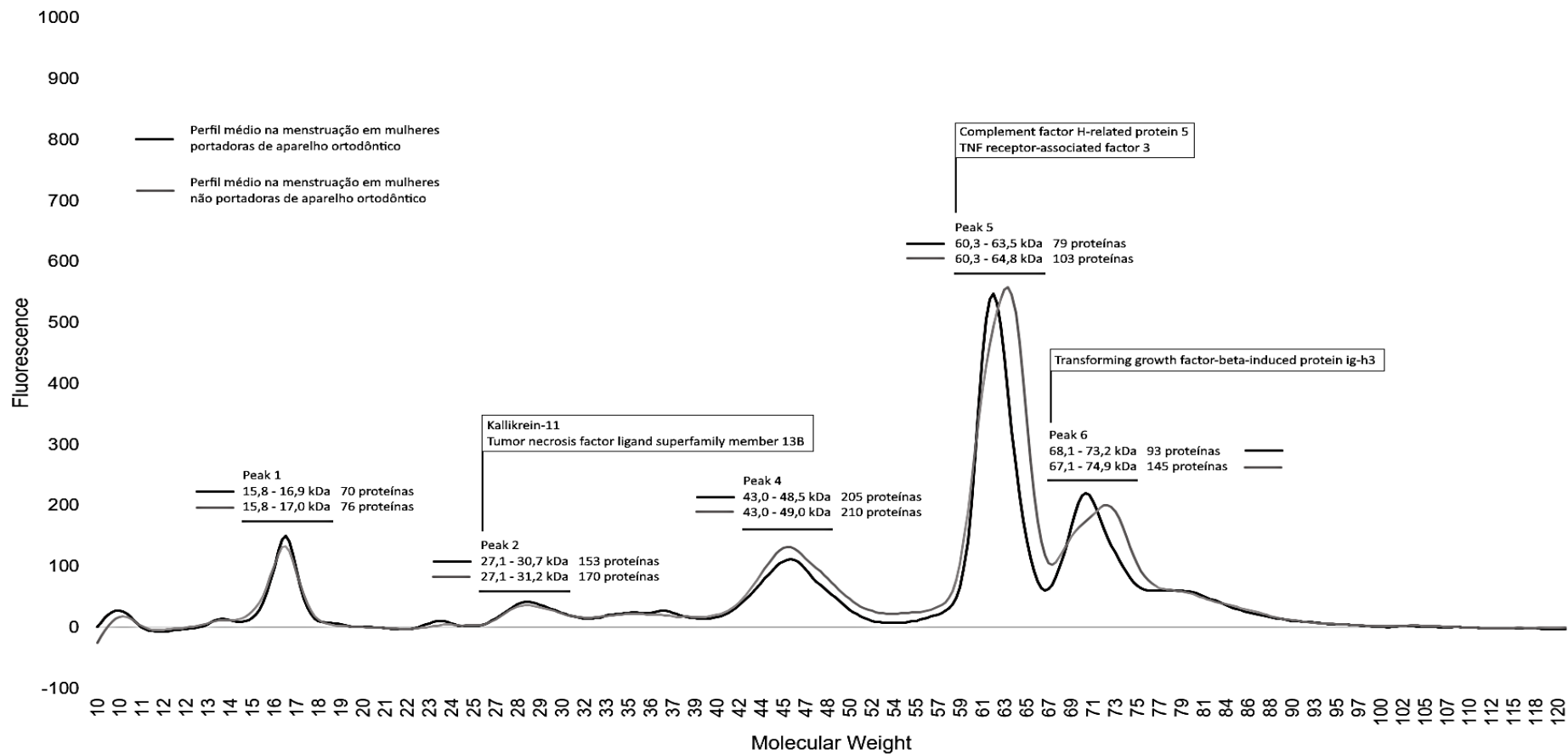


Figura 31 - Perfil médio da fase da menstruação do ciclo hormonal em mulheres portadoras e não portadoras de aparelho ortodôntico. Apresentação do intervalo de massas moleculares e do número total das proteínas identificadas em cada pico. Nos picos 2, 5 e 6 é demonstrado as proteínas que identificam esta fase do ciclo hormonal.

Tabela 17 - Identificação das 45 proteínas exclusivas da fase do meio do ciclo hormonal. A rosa estão destacadas as proteínas nos principais mecanismos moleculares relacionados com a fisiologia do ciclo hormonal.

Q04118	Basic salivary proline-rich protein 3 (Parotid salivary glycoprotein G1) (Proline-rich protein G1)
P29692	Elongation factor 1-delta (EF-1-delta) (Antigen NY-CO-4)
Q9UBX7	Kallikrein-11 (hK11) (EC 3.4.21.-) (Hippostasin) (Serine protease 20) (Trypsin-like protease) [Cleaved into: Kallikrein-11 inactive chain 1; Kallikrein-11 inactive chain 2]
B3KSA0	cDNA FLJ35812 fis, clone TESTI2006051, highly similar to Acyl-coenzyme A thioesterase 1 (EC 3.1.2.2)
Q8N7E6	cDNA FLJ25727 fis, clone TST05479
Q9Y275	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B (B lymphocyte stimulator) (BLyS) (B-cell-activating factor) (BAFF) (Dendritic cell-derived TNF-like molecule) (TNF- and APOL-related leukocyte expressed ligand 1) (TALL-1) (CD antigen CD257) [Cleaved into: Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13b, membrane form; Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13b, soluble form]
Q8N7K7	cDNA FLJ40941 fis, clone UTERU2008426
Q16094	Calnexin (Fragment)
Q13126	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase (EC 2.4.2.28) (5'-methylthioadenosine phosphorylase) (MTA phosphorylase) (MTAP) (MTAPase)
Q9Y483	Metal-response element-binding transcription factor 2 (Metal regulatory transcription factor 2) (Metal-response element DNA-binding protein M96) (Polycomb-like protein 2) (hPCI2)
P32456	Guanylate-binding protein 2 (EC 3.6.5.-) (GTP-binding protein 2) (GBP-2) (HuGBP-2) (Guanine nucleotide-binding protein 2) (Interferon-induced guanylate-binding protein 2)
Q9BWM5	Zinc finger protein 416
P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1 (2'-5'-oligoadenylate-binding protein) (HuHP68) (RNase L inhibitor) (Ribonuclease 4 inhibitor) (RNS4I)
P50895	Basal cell adhesion molecule (Auberger B antigen) (B-CAM cell surface glycoprotein) (F8/G253 antigen) (Lutheran antigen) (Lutheran blood group glycoprotein) (CD antigen CD239)
Q15300	RET tyrosine kinase/cAMP protein kinase A subunit RI
P29350	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (EC 3.1.3.48) (Hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase) (Protein-tyrosine phosphatase 1C) (PTP-1C) (Protein-tyrosine phosphatase SHP-1) (SH-PTP1)
P27824	Calnexin (IP90) (Major histocompatibility complex class I antigen-binding protein p88) (p90)
Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1 (FBP) (FUSE-binding protein 1) (DNA helicase V) (hDH V)
Q8TDN4	CDK5 and ABL1 enzyme substrate 1 (Interactor with CDK3 1) (Ik3-1)
P15923	Transcription factor E2-alpha (Class B basic helix-loop-helix protein 21) (bHLHb21) (Immunoglobulin enhancer-binding factor E12/E47) (Immunoglobulin transcription factor 1) (Kappa-E2-binding factor) (Transcription factor 3) (TCF-3) (Transcription factor ITF-1)
P02545	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C (70 kDa lamin) (Renal carcinoma antigen NY-REN-32)]
Q9UM07	Protein-arginine deiminase type-4 (EC 3.5.3.15) (HL-60 PAD) (Peptidylarginine deiminase IV) (Protein-arginine deiminase type IV)
Q14166	Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12

Q15067	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (AOX) (EC 1.3.3.6) (Palmitoyl-CoA oxidase) (Straight-chain acyl-CoA oxidase) (SCOX)
Q86T29	Zinc finger protein 605
Q6P9A3	Zinc finger protein 549
Q12934	Filensin (Beaded filament structural protein 1) (Lens fiber cell beaded-filament structural protein CP 115) (CP115) (Lens intermediate filament-like heavy) (LIFL-H)
P18850	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha (cAMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha) (Activating transcription factor 6 alpha) (ATF6-alpha) [Cleaved into: Processed cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha]
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (Beta ig-h3) (Kerato-epithelin) (RGD-containing collagen-associated protein) (RGD-CAP)
P08236	Beta-glucuronidase (EC 3.2.1.31) (Beta-G1)
Q9ULC6	Protein-arginine deiminase type-1 (EC 3.5.3.15) (Peptidylarginine deiminase I) (Protein-arginine deiminase type I)
P16050	Arachidonate 15-lipoxygenase (15-LOX) (15-LOX-1) (EC 1.13.11.33) (12/15-lipoxygenase) (Arachidonate 12-lipoxygenase, leukocyte-type) (12-LOX) (EC 1.13.11.31) (Arachidonate omega-6 lipoxygenase)
Q96N76	Urocanate hydratase (Urocanase) (EC 4.2.1.49) (Imidazolonepropionate hydrolase)
Q8TDF6	RAS guanyl-releasing protein 4
P12035	Keratin, type II cytoskeletal 3 (65 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-3) (CK-3) (Keratin-3) (K3) (Type-II keratin Kb3)
Q9H8W5	Tripartite motif-containing protein 45 (RING finger protein 99)
Q9BXR6	Complement factor H-related protein 5 (FHR-5)
P49023	Paxillin
Q53H57	Carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1.-) (Fragment)
Q86U44	N6-adenosine-methyltransferase catalytic subunit (EC 2.1.1.62) (Methyltransferase-like protein 3) (hMETTL3) (N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit) (MT-A70)
Q13114	TNF receptor-associated factor 3 (EC 2.3.2.27) (CAP-1) (CD40 receptor-associated factor 1) (CRAF1) (CD40-binding protein) (CD40BP) (LMP1-associated protein 1) (LAP1) (RING-type E3 ubiquitin transferase TRAF3)
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Cleaved into: Bifunctional purine biosynthesis protein PURH, N-terminally processed] [Includes: Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3) (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase) (AICAR transformylase); IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) (ATIC) (IMP synthase) (Inosinicase)]
Q10471	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (EC 2.4.1.41) (Polypeptide GalNAc transferase 2) (GalNAc-T2) (pp-GaNTase 2) (Protein-UDP acetylgalactosaminyltransferase 2) (UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2) [Cleaved into: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 soluble form]
Q96RR4	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaM-KK 2) (CaM-kinase kinase 2) (CaMKK 2) (EC 2.7.11.17) (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta) (CaM-KK beta) (CaM-kinase kinase beta) (CaMKK beta)
Q9NSB2	Keratin, type II cuticular Hb4 (Keratin-84) (K84) (Type II hair keratin Hb4) (Type-II keratin Kb24)

## **III. Conclusão**



Com este trabalho demonstrámos a utilização do algoritmo do SalivaPrint para identificar fases do ciclo hormonal. Foi estabelecido o SalivaPrint para cada fase do ciclo hormonal, isto é, o perfil de proteínas da saliva que caracterizam cada uma das fases do ciclo hormonal: início, meio e menstruação. Não foram encontradas proteínas que caracterizam o fim do ciclo hormonal.

O SalivaPrint mostrou adicionalmente que ocorrem alterações na expressão de proteínas ao longo do ciclo hormonal, que são dependentes da população ser ou não portadora de aparelho ortodôntico.

O SalivaPrint permitiu identificar quais as proteínas e respetivos mecanismos comprometidos em portadores de aparelho ortodôntico.

A estratégia de utilização do SalivaPrint é interessante e pode ser desenvolvida e aperfeiçoada para o desenvolvimento de dispositivo para autoavaliação e identificação das fases do ciclo hormonal da mulher.

Com este trabalho ficam também identificadas potenciais proteínas com interesse para serem quantificadas em trabalhos futuros visando identificar mecanismos comprometidos em mulheres com alterações do seu ciclo reprodutivo.



## **IV. Bibliografia**



1. Güncü GN, Tözüm TF, Çağlayan F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium--review of literature. *Aust Dent J.* 2005;50(3):138–45.
2. Reis M, Matos MG. Conhecimentos e atitudes face ao uso de métodos contraceptivos e à prevenção das ISTs em jovens. *Rev Lusófona Ciências e Tecnol da Saúde.* 2007;(4):23–35.
3. Committee P, Society A. Hormonal contraception: Recent advances and controversies. *Fertil Steril [Internet].* 2004;82(2):520–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.093>
4. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Anatomy & Physiology. In: 8ª. Lusociência; 2011. p. 1083–90.
5. Markou E, Eleana B, Lazaros T, Antonios K. The influence of sex steroid hormones on gingiva of women. *Open Dent J.* 2009;3:114–9.
6. Adelina M, Guanais B. Medicina periodontal e a mulher : a importância do seu conhecimento para uma abordagem preventiva por ginecologistas / obstetras e cirurgiões-dentistas. 2007;16(3):175–85.
7. Moore K, Dalley A. Anatomia Orientada para a Clínica. 5ª. Koogan EG, editor. 2007.
8. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª. Elsevier, editor. Rio de Janeiro; 2006.
9. Mariotti A. Sex Steroid Hormones and Cell Dynamics in the Periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994;5(1):27–53.
10. Erkkola R. Recent advances in hormonal contraception. *Curr Opin Obs Gynecol.* 2007;19(6):547–53.
11. Helles A. No Title. *Arch Pharm Chem.* 1971;78:2–9.
12. Farhad SZ, Esfahanian V, Mafi M, Farkhani N, Ghafari M, Refiei E, et al. Association between Oral Contraceptive Use and Interleukin-6 Levels and Periodontal Health. *Periodontology Implant Dent.* 2013;13–7.
13. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science (80-).* 1986;
14. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;
15. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang H-L. Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol.* 2003;30:671–81.
16. Vittek J, Hernandez MR WE. Specific estrogen receptors in human gingiva. *J Clin Endocrin Metab.* 1982;54(3):608–12.
17. Preshaw PM, Knutsen MA, Mariotti A. Experimental gingivitis in women using oral contraceptives. *J Dent Res.* 2001;80(11):2011–5.
18. Gornstein RA, Lapp CA, Bustos-Valdes SM, Zamorano P. Androgens Modulate Interleukin-6 Production by Gingival Fibroblasts In Vitro. *J*

- Periodontol. 1999;
19. Sooriyamoorthy M, Grower D. Hormonal influences on gingival tissues: relationship to periodontol disease. J Clin Periodontol. 1989;16(4):201–8.
  20. Muramatsu Y, Takaesu Y. Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. Bull Tokyo Dent Coll. 1994;35(3):139–51.
  21. Gusberti FA, et al. Changes in subgingival microbiota during puberty. A 4-year longitudinal study. J Clin Periodontol. 1990;17(10):685–92.
  22. Zeba Jafri, Ashu Bhardwaaj, Madhui Sawai NS. Influence of female sex hormones on periodontium: A case series. J Nat Sci Biol Med. 2015;6:146–9.
  23. Lindhe J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5ª. GUANABARA N, editor. 2010.
  24. Americo CF, Nogueira PSF, Vieira RPR, Bezerra CG, Moura ERF, Lopes MV de O. Conhecimento de usuarias de anticoncepcional oral combinado de baixa dose sobre o metodo. Rev Lat Am Enfermagem [Internet]. 2013;21(4):928–34. Available from: <http://www.revistas.usp.br/rlae/article/view/76005>
  25. Neinstein LS, Katz B. Contraception and chronic illnesses: cardiac disease. Contracept Technol Update. 1984;
  26. Madigan D, Shin J. Drospirenone-containing oral contraceptives and venous thromboembolism: an analysis of the FAERS database. Open Access J Contracept [Internet]. 2018;Volume 9:29–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29720882><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5919164><https://www.dovepress.com/drospirenone-containing-oral-contraceptives-and-venous-thromboembolism-peer-reviewed-article-OAJC>
  27. Rott H. Thrombotic risks of oral contraceptives. Curr Opin Obstet Gynecol. 2012;24(4):235–40.
  28. Shapiro S. Oral contraceptives, hormone therapy and cardiovascular risk. Climacteric. 2008;11(5):355–63.
  29. Khalili H, Chan AT. Author response: Oral contraceptives and Crohn's disease. Gut. 2015.
  30. Folco A a, Benítez-rogé SC, Iglesias M, Calabrese D, Pelizardi C, Rosa A, et al. Gingival Response in Orthodontic Patients . Comparative Study Between Self-Ligating and Conventional Brackets. Acta Odontol Latinoam. 2014;27:120–4.
  31. Goes P, Dutra CS, Lisboa MRP, Gondim D V., Leitão R, Brito GAC, et al. Clinical efficacy of a 1% *Matricaria chamomile* L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. J Oral Sci [Internet]. 2016;58(4):569–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28025442><https://www.jstage.jst>

go.jp/article/josnusd/58/4/58\_16-0280/\_article%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28025442%0Ahttp://www.jstage.jst.go.jp/article/josnusd/58/4/58\_16-0280/\_article

32. Demling A, Heuer W, Elter C, Heidenblut T, Bach FW, Schwestka-Polly R, et al. Analysis of supra- and subgingival long-term biofilm formation on orthodontic bands. *Eur J Orthod*. 2009;31(2):202–6.
33. 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*. 2009;
34. 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*. 2012;57(7):853–64.
35. 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* [Internet]. 2016;14(4):289–97. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/bio.2015.0054>
36. 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.
37. 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.
38. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT de, Tajara EH. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(3):366–75.
39. Espindola FS, Calábria LK, De AAA, Pereira BB, Santana FA, Marques I, et al. Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica , transcriptômica , proteômica , bioinformatic resources applied on the omic sciences. 2010;(June):463–77.
40. 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(August 2017):81–6.
41. Biazevi, Gabriela MH, Frias CA. Levantamentos em saúde bucal. 2017. 129 p.
42. Valente O, Atallah A., Sustovich D. Efeitos metabólicos e manuseio clínico dos corticosteróides [Internet]. p. 1191–3. Available from: [http://centrocochranedobrasil.org.br/cms/apl/artigos/artigo\\_468.pdf](http://centrocochranedobrasil.org.br/cms/apl/artigos/artigo_468.pdf)
43. Carvalho AE, Santos I das G, Cury VF. A influência do tabagismo na doença periodontal: revisão de literatura |Tabagism Influence on Periodontal Diseases: Literature Review. *Rev Virtual Odontol*. 2008;5(2):7–12.
44. Garcia PPNS, Campos FP De, Rodrigues JDA, Santos PA Dos, Dovigo LN. Avaliação dos efeitos da educação e motivação sobre o conhecimento

- e comportamento de higiene bucal em adultos. *Ciência Odontológica Bras* [Internet]. 2004;7(3):30–9. Available from: <http://ojs.fosjc.unesp.br/index.php/cob/article/download/304/239>
45. Zachrisson B., Zachrisson S. Gengival Condition Associated with Orthodontic Treatment. *Angle Orthod.* 1972;42(4):26–34.
  46. Pinelli LAP, Marra J, Fais LMG, Silva RHBT, Guaglianoni DG. Análise da condição de higiene oral de pacientes usuários de prótese parcial fixa. *Rev Odontológica do Bras Cent.* 2007;16(42):1–6.
  47. Andrade FB, Jovino-Silveira RC, Araújo AC, Melo JF, Fonseca FL. Avaliação de efeito clínico de enxaguatório oral com cloridrato polihexametileno biguanida (0,35%) sobre a gengivite e o biofilme dentário. *Derecho y Cambio Soc.* 2016;
  48. Cardoso K, Zimmermann G, Resumo B, Ufsc E, Especialista SC, Marlene I, et al. Vida da Mulher no Climatério : Um mapeamento das alterações manifestadas. 2011;
  49. Poy M, Wiltgen D, Spritzer PM. Perfil Hormonal e Metabólico em Pacientes Hirsutas com a Síndrome dos Ovários Policísticos. 2001;45:352–60.
  50. Almeida RF, Morado Pinho M, Lima C, Faria I, Santos P, Bordalo C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Rev Port Clínica Geral.* 2006;22:379–90.
  51. Anderson R, Israel MS, Eliza M, Ramos B. Piercing oral : fator de risco para o câncer ? 2007;233–9.
  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. Oliveros JC. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. 2007--2015. [http. bioinfogp. cnb. csic. es/tools/venny/index. html](http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html). Accessed. 2016.
  54. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the panther classification system. *Nat Protoc.* 2013;
  55. Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* 2013;
  56. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D362–8.
  57. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013;
  58. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015;

59. Cypriano S, de Sousa MLR, Wada RS. Avaliação de índices CPOD simplificados em levantamentos epidemiológicos de cárie dentária. *Rev Saude Publica*. 2005;39(2):285–92.
60. R. F. The determinants of dental health attitudes and behaviours. *Br Dent J*. 1999;187(1):15–8.
61. Heintze S. A profilaxia individual em pacientes com aparelhos fixos: recomendações para o consultório. *Ortodontia*. 1996;29(2):4–15.
62. Vanishree T, Panchmal, Ganesh Shenoy Shenoy R, Jodalli P, Sonde, Laxminarayan Kundapur N. Changes in the Oral Environment after Placement of Fixed Orthodontic Appliance for the Treatment of Malocclusion - a Descriptive Longitudinal Study. *Oral Heal Prev Dent*. 2017;15(5):453–9.
63. Baliga S, Muglikar S, Rahul K. Salivary pH: A diagnostic biomarker. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(4):461–465.
64. Humphrey S, Williamson R. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85(2):162–9.
65. Freitas L, Fernanda S, Lopes F, Emília A. Estudo sobre o Fluxo Salivar e Xerostomia em Mulheres na Pré e Study of Salivary Flow and Xerostomia in Pre- and Postmenopausal Women. 2007;125–9.
66. Ribeiro JS, Camargo ES, Bracnher JA, Giovanna Simião Ferreira, Ribeiro JS. A variação de cálcio, amilase, glicose, proteínas totais, fluxo, ph e capacidade de tamponamento da saliva de pacientes em tratamento ortodôntico interceptativo. *Odontologia - CCBS*. 2010.
67. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front Immunol*. 2015;6(DEC):1–8.
68. Leung D, Cachianes G, Kuang W, Goeddel D, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (80- )*. 1989;
69. Bartlett JD, Simmer JP. Kallikrein-related peptidase-4 (KLK4): Role in enamel formation and revelations from ablated mice. *Front Physiol*. 2014;5 JUL(July):1–7.
70. Stefanini ACB, Da Cunha BR, Henrique T, Tajara EH. Involvement of kallikrein-related peptidases in normal and pathologic processes. *Dis Markers*. 2015;2015.
71. Le MH, Nakano Y, Uyghurturk DA, Zhu L. Fluoride Alters Klk4 Expression in Maturation Ameloblasts through Androgen and Progesterone Receptor Signaling. 2017;8(November):1–10.
72. Roberts F. A survey of salivary kallikrein and amylase in a population of schoolgirls, throughout the menstrual cycle. 1978;561–5.
73. Ferreira ACP, Montes MBA, Franceschini SA, Toloí MRT. Efeitos do contraceptivo oral contendo 20 µg de etinilestradiol e 150 µg de desogestrel sobre os sistemas de coagulação e fibrinólise. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000;22(2):77–87.

74. Duarte A. Os anticoncepcionais orais como fatores de risco para a trombose venosa profunda [Internet]. Faculdade de Ciências da Educação e Saúde; 2017. Available from: <http://repositorio.uniceub.br/bitstream/235/11698/1/21458873.pdf>
75. Röblitz S, Stötzel C, Deuflhard P, Jones HM, Azulay DO, van der Graaf PH, et al. A mathematical model of the human menstrual cycle for the administration of GnRH analogues. *J Theor Biol.* 2013;321:8–27.
76. Bertozzi RI. Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento. 2011;
77. Ilha GF. Caracterização Do Sistema Calicreína- Cinina Durante O Processo Ovulatório De. 2011;1–40.
78. Schmaier AH. The contact activation and kallikrein/kinin systems: Pathophysiologic and physiologic activities. *J Thromb Haemost.* 2016;14(1):28–39.
79. Mohammed BM, Matafonov A, Ivanov I, Sun M fu, Cheng Q, Dickeson SK, et al. An update on factor XI structure and function. *Thromb Res* [Internet]. 2018;161:94–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.10.008>
80. Machado PRL, Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol.* 2004;79(6):647–64.
81. Glickman MH, Adir N. The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. *PLoS Biology.* 2004.
82. McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J. Protein quality control: Chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol.* 2005;
83. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: The long road to destruction. *Nature Cell Biology.* 2005.
84. Mulero JJ, Boyle BJ, Bradley S, Bright JM, Nelken ST, Ho TT, et al. Three new human members of the lipid transfer/lipopolysaccharide binding protein family (LT/LBP). *Immunogenetics.* 2002;54(5):293–300.
85. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev.* 2001;
86. Mayer G. Imunologia – capítulo dois Complemento [Internet]. University of South Carolina School of Medicine. 2005 [cited 2018 Jun 13]. Available from: <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/immuno-port-chapter2.htm>
87. Castronovo V, Blomme A, Delvaux D, Delvenne P, Detry O, Turtoi A. Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 is essential for the formation of human colorectal carcinoma liver metastasis in vivo. *FASEB J.* 2013;27(1).

## **V. Apêndices**



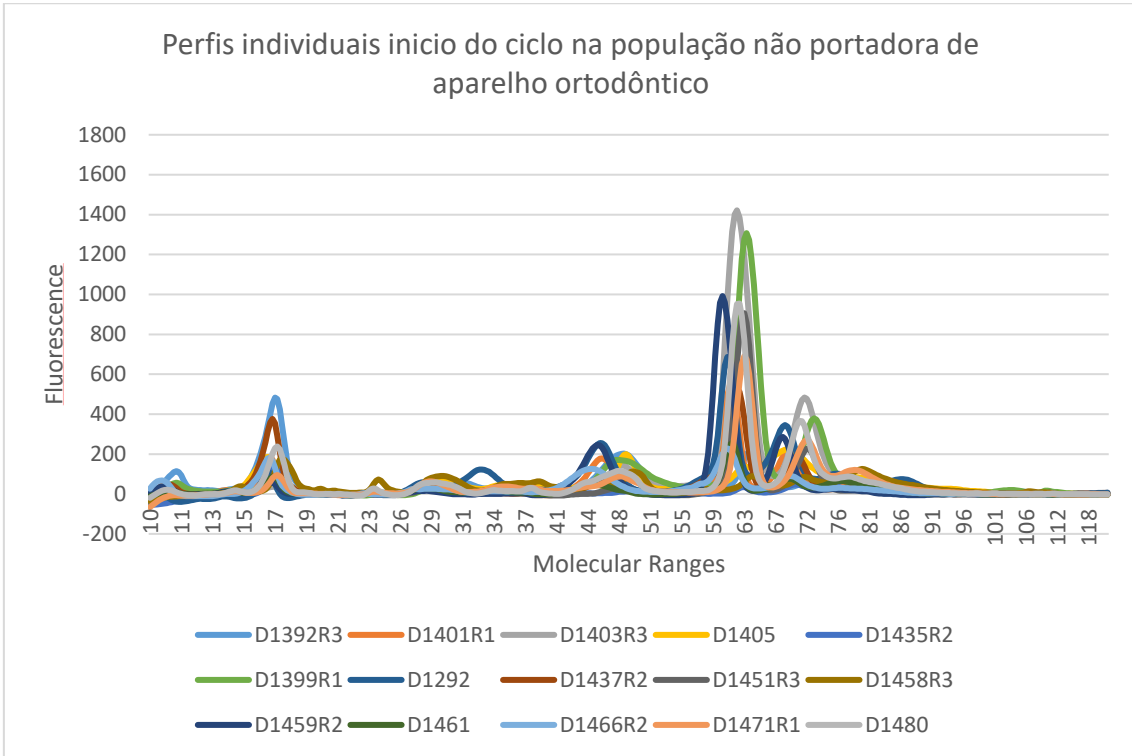


Figura 32 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do início do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.

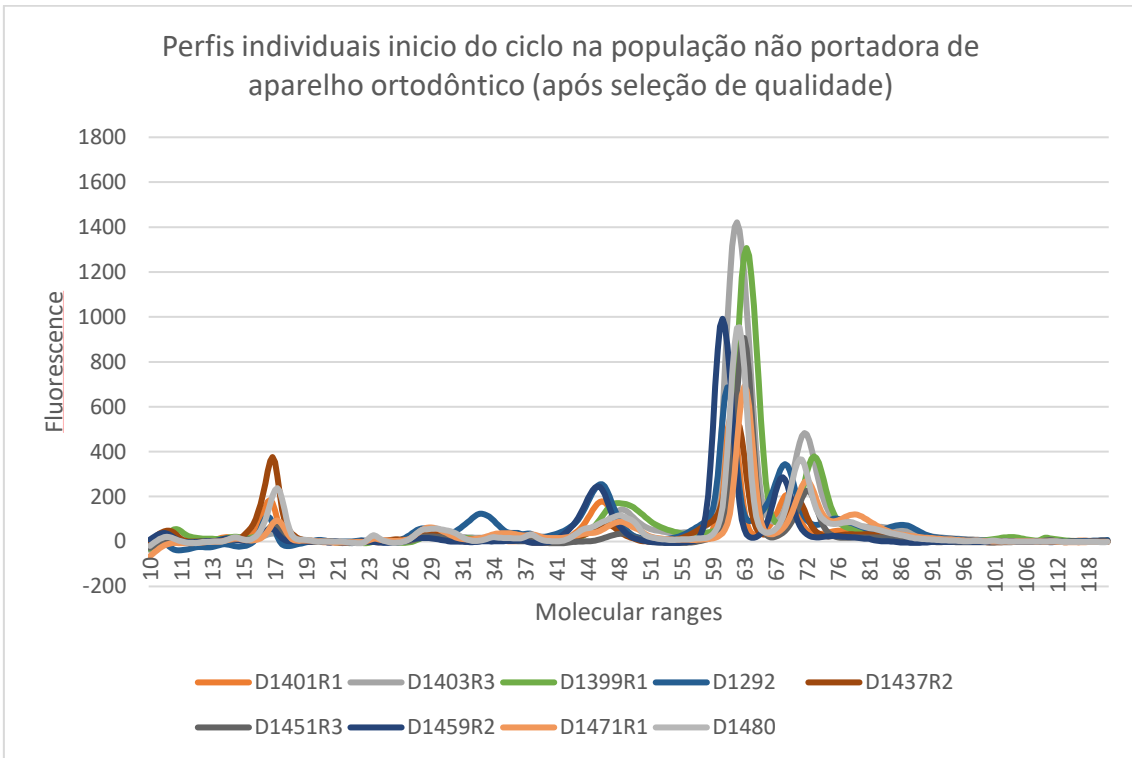


Figura 33 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do início do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados.

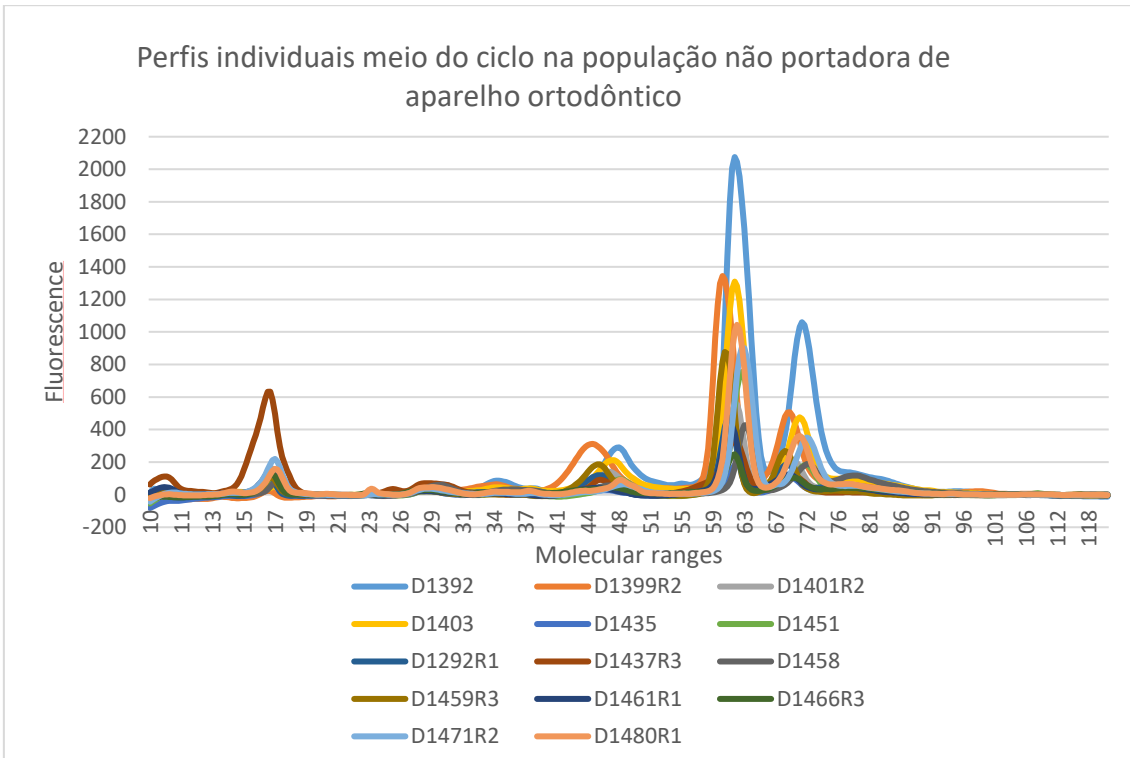


Figura 34 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do meio do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.

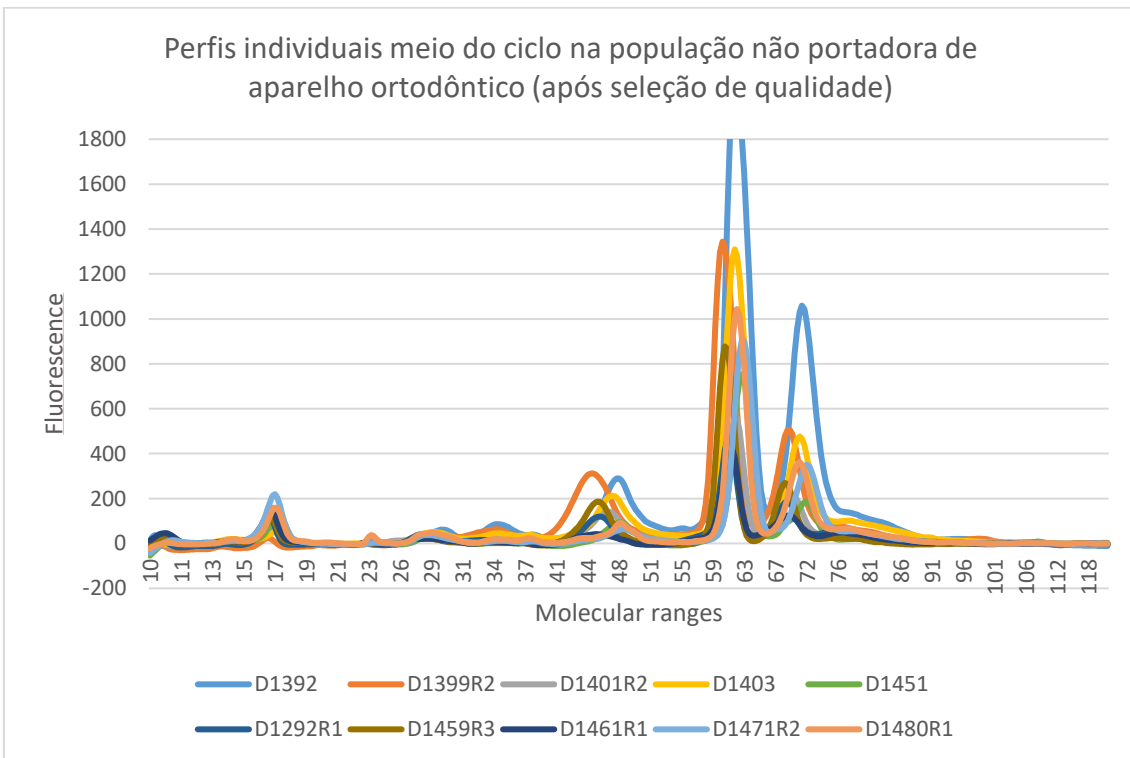


Figura 35 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do meio do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados.

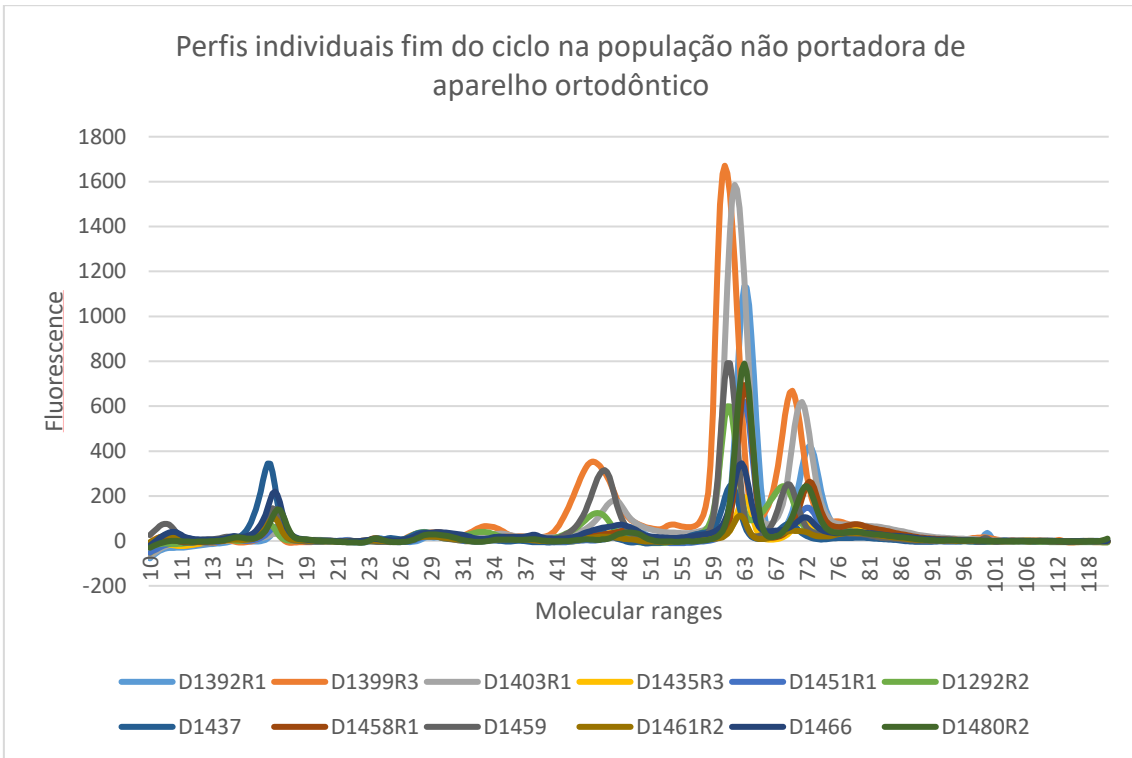


Figura 36 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do fim do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.

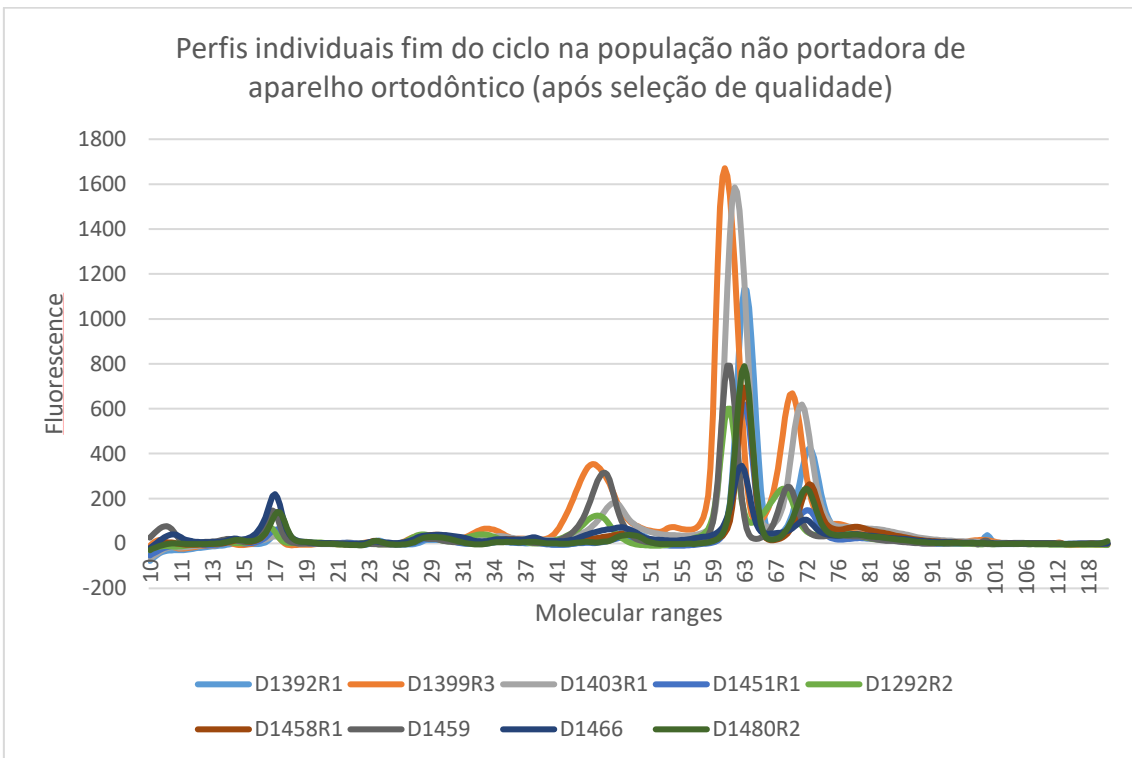


Figura 37 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do fim do ciclo na população não portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados.

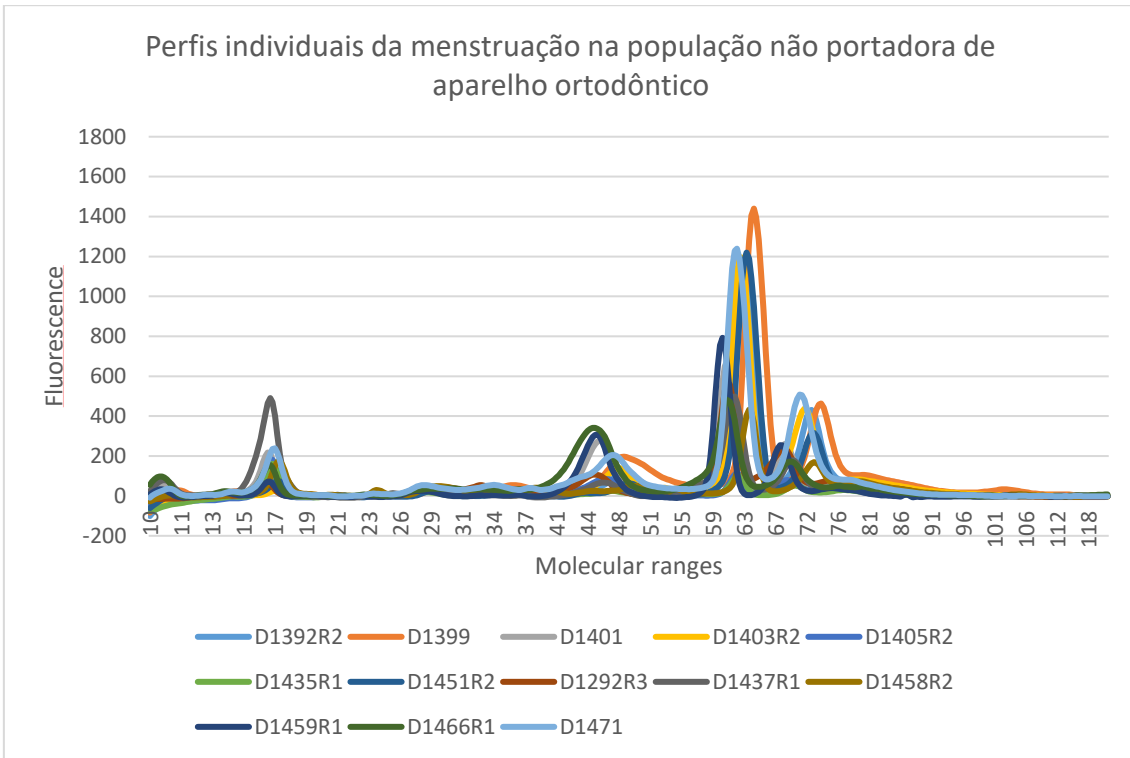


Figura 38 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.

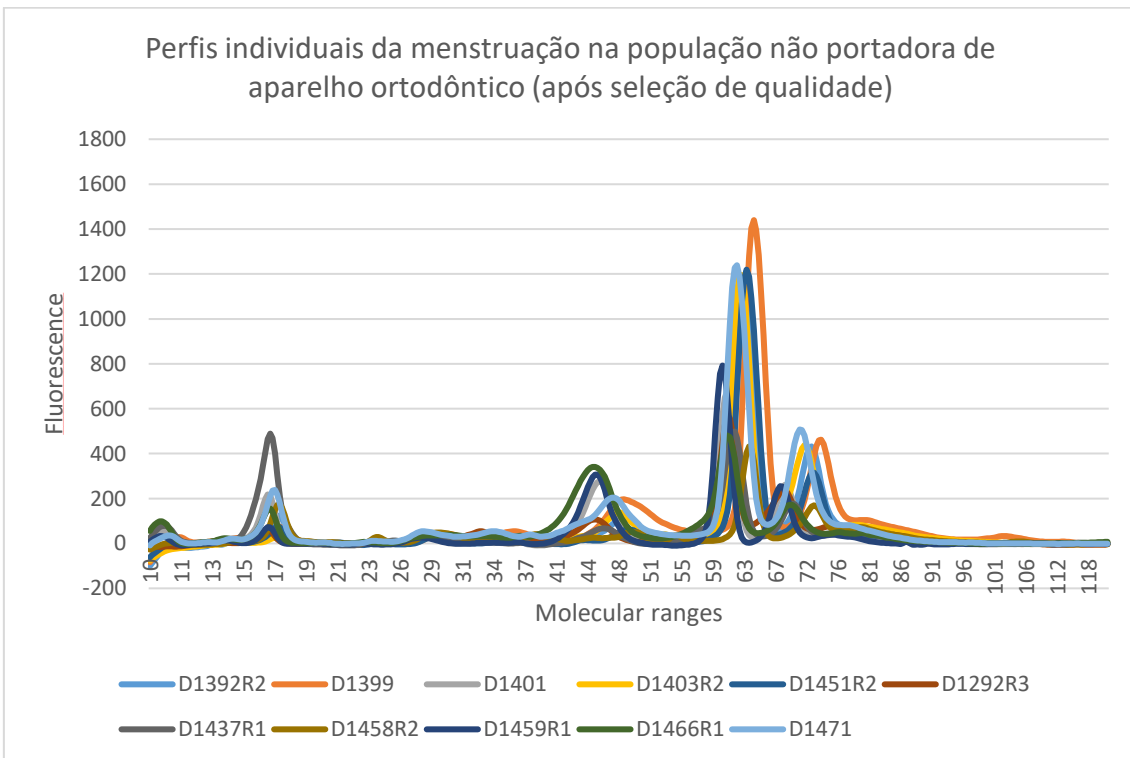


Figura 39 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase da menstruação na população não portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados.

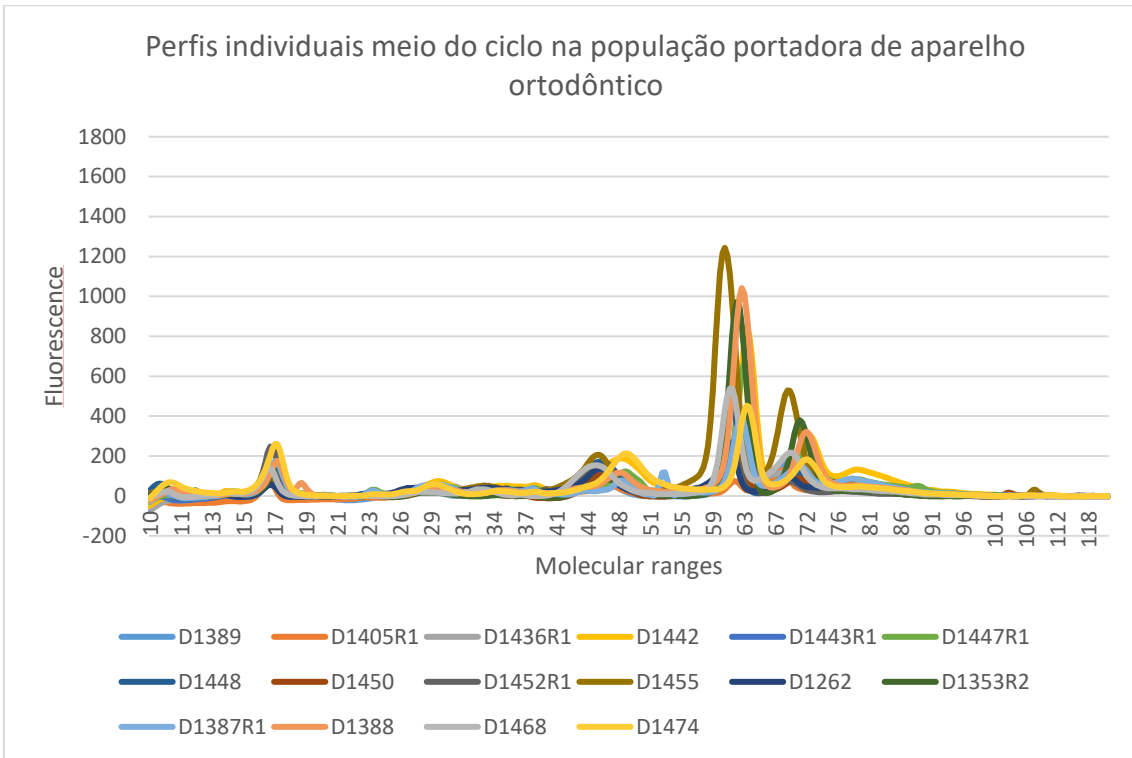


Figura 40 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do meio do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.

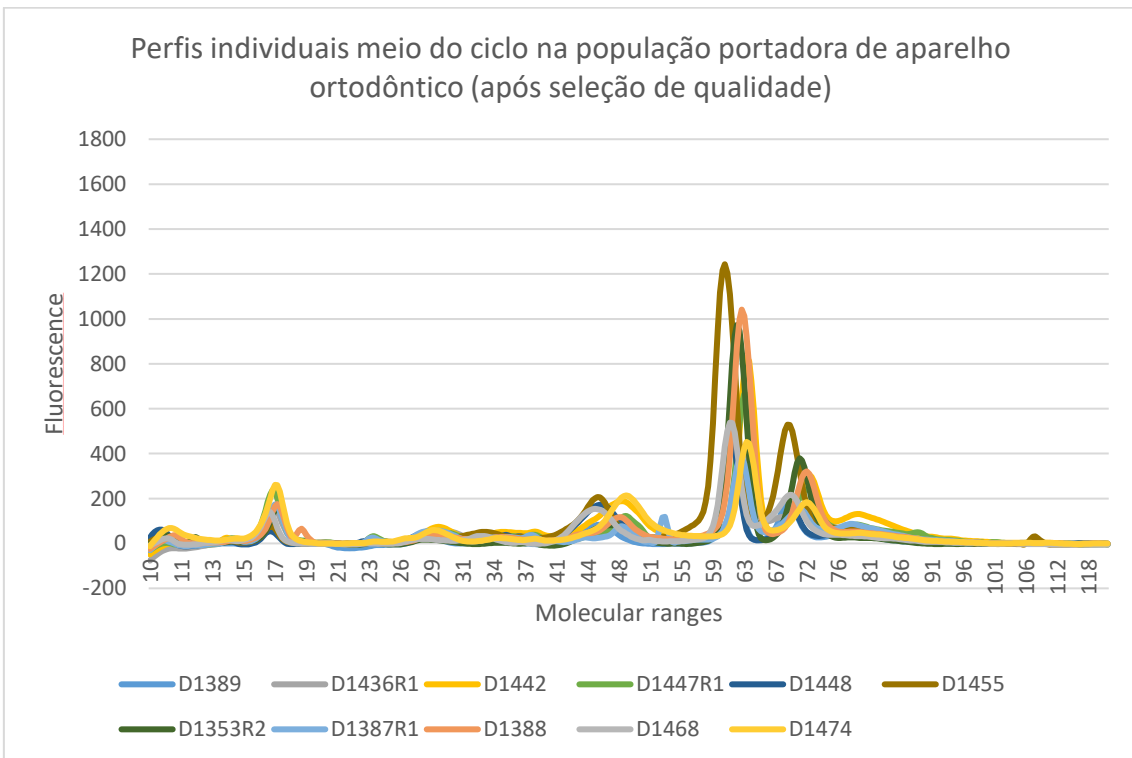


Figura 41 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do meio do ciclo na portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados.

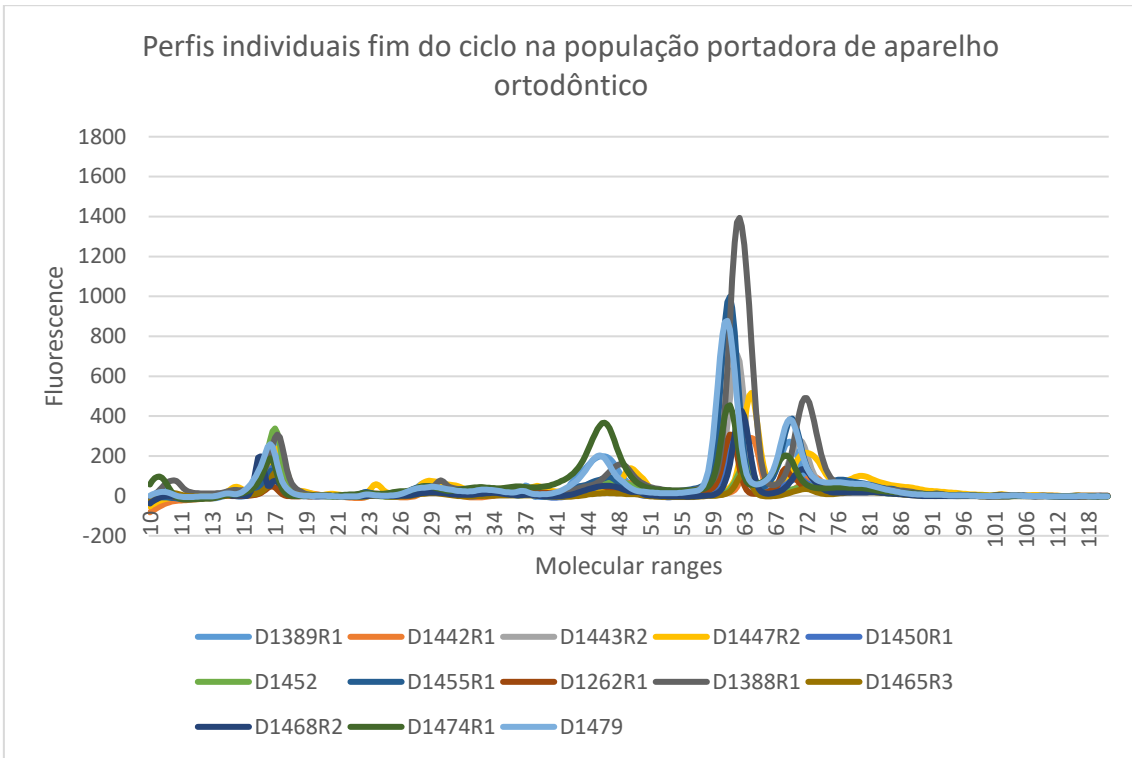


Figura 42 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do fim do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.

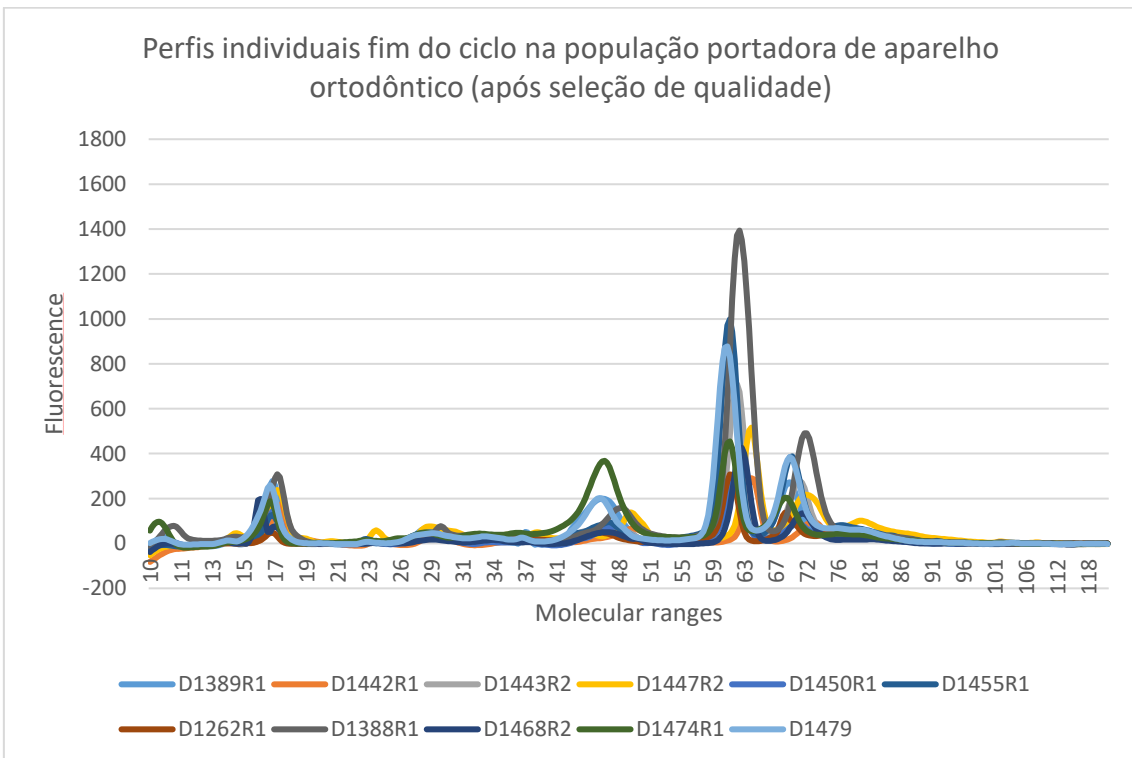


Figura 43 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase do fim do ciclo na população portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados.

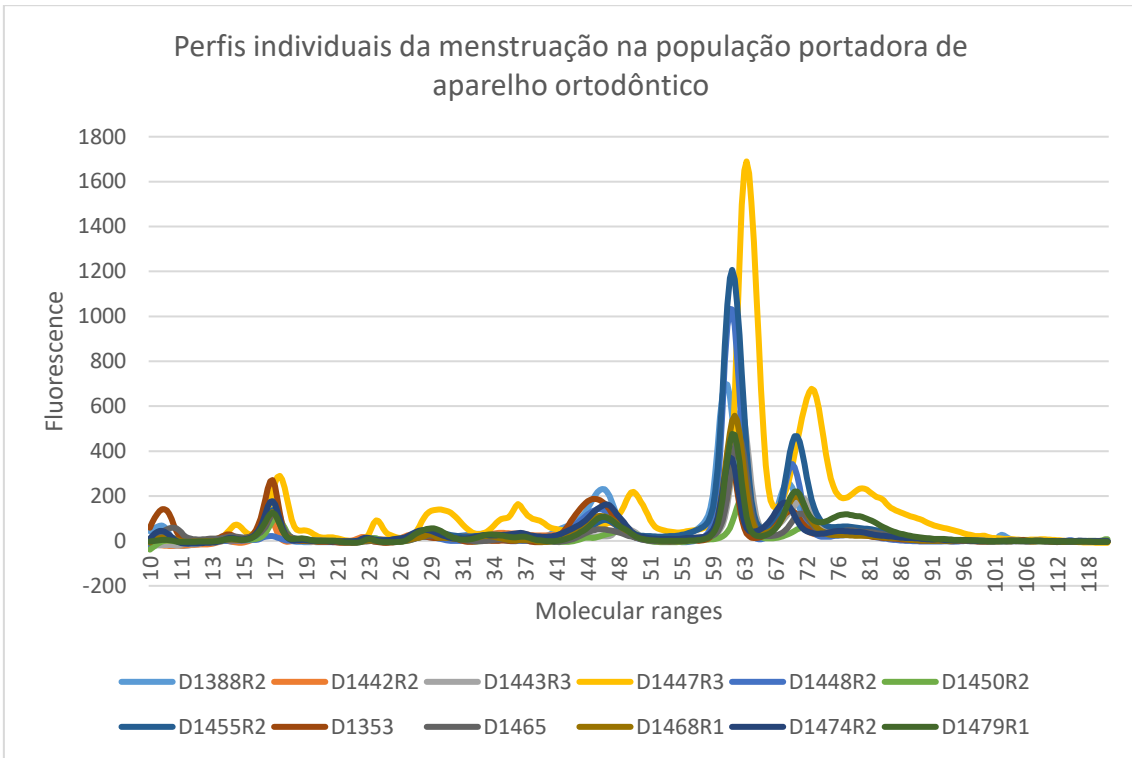


Figura 44 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase da menstruação na população portadora de aparelho ortodôntico sem perfis selecionados.

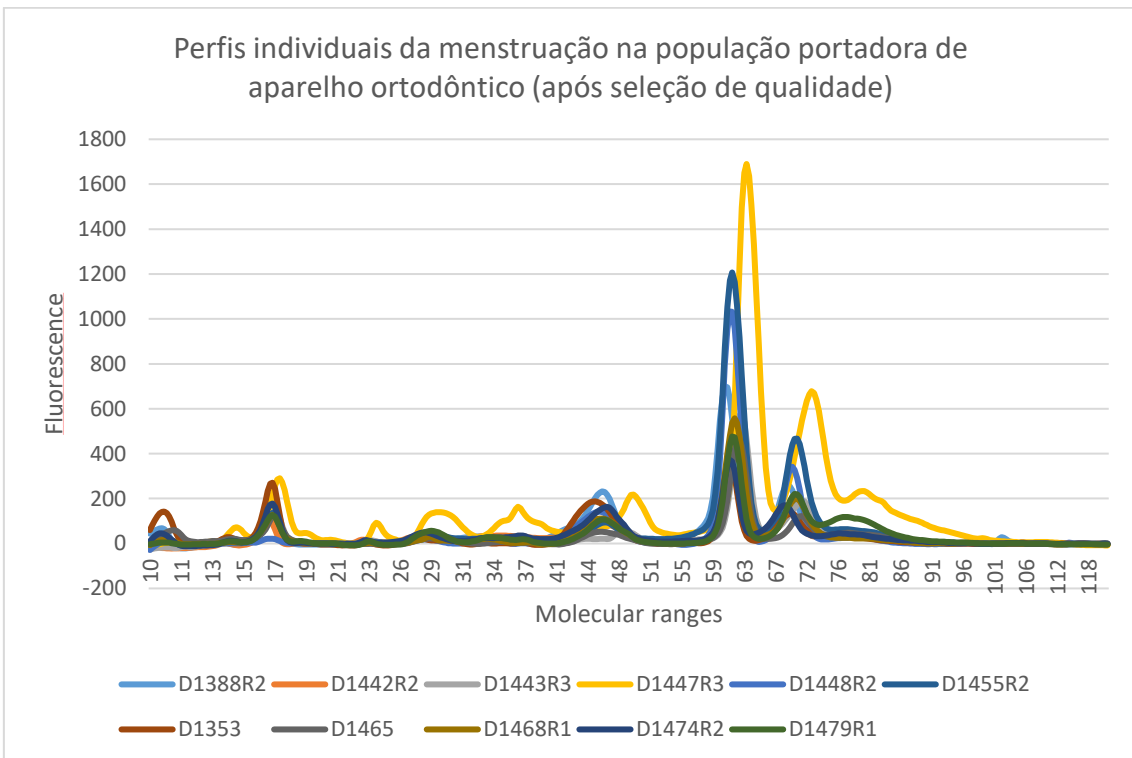


Figura 45 - Perfis totais de proteínas de cada indivíduo na fase da na população portadora de aparelho ortodôntico com perfis selecionados.



## **VI. Anexos**



## Anexo 1: Consentimento Informado



### UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

salivaTec - UCP

Laboratório de Investigação  
Interdisciplinar em Sa

### INFORMAÇÃO AO DADOR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Título do projeto de investigação

---

Projeto de investigação que irá decorrer no SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa.

#### Objetivo do Estudo

A recolha de amostras biológicas humanas e seu posterior armazenamento no Biobanco de amostras do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, permitirá a realização de investigação para o esclarecimento a nível molecular de doenças e para o desenvolvimento de diagnóstico e em múltiplas áreas da Saúde. Contudo, este objetivo só será cumprido com a colaboração dos doentes e de indivíduos saudáveis, através da doação de amostras biológicas que serão guardadas e preservadas em condições apropriadas de forma a serem utilizadas para futuros estudos. Caso o doente ou indivíduo saudável e/ou o seu representante legal decida participar, terá de fazer apenas os procedimentos habituais de uma consulta.

#### Procedimentos

No caso de concordar em participar neste projeto, ser-lhe-á colhida uma amostra biológica. A amostra habitualmente solicitada será realizada a partir da colheita de saliva. Para os indivíduos que estejam a realizar exames diagnósticos ou que estejam a ser sujeitos a tratamentos cirúrgicos poderá ser pedida autorização para colheita de uma pequena amostra do material removido durante o procedimento (como por exemplo tecidos removidos para biópsias ou removidos no decurso de cirurgias). Estas colheitas serão efetuadas sem alterar os procedimentos médicos habituais e sem interferir com a rentabilidade diagnóstica do procedimento ou com o sucesso da cirurgia. Esta amostra será preservada em condições apropriadas e as informações clínicas com ela relacionada serão introduzidas numa base de dados, passando a sua identificação pessoal a estar codificada e não acessível aos utilizadores das amostras.

A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador, ou o seu representante legal, tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração assim que achar conveniente, sem necessidade de justificação e não podendo ser discriminado por isso. O dador ou o seu representante legal deverá manifestar por escrito a sua vontade em retirar a amostra ou interromper a colaboração e nestas situações a amostra será imediatamente destruída.

O SalivaTec propõe-se armazenar as amostras biológicas e seus possíveis derivados tais como DNA e RNA nas instalações do Biobanco do Instituto de Medicina Molecular. O SalivaTec não divulgará resultados envolvendo o material biológico. No entanto, o dador poderá escolher se quer ser informado dos resultados com potencial relevância para a sua saúde. O pedido de resultados deverá ser feito por escrito para o SalivaTec pelo dador ou representante legal e deve ser expresso no consentimento informado.

Serão cumpridas todas as normas éticas aceites internacionalmente para o uso de matérias biológicas para fins de investigação. Todos os projetos que fizerem uso das amostras depositadas no Biobanco serão submetidos à Comissão de Ética competente para a sua avaliação.

Identificação das amostras e Confidencialidade

A existência de um Biobanco pressupõe a existência de uma base de dados contendo informação clínica referente ao doente ou indivíduo saudável. Após a colheita, as amostras serão identificadas por um código de forma a preservar a privacidade.

Durante o desenvolvimento de um projeto de investigação, a equipa de investigação poderá ter necessidade de recolher informação do processo clínico para a execução do estudo. O anonimato será, contudo mantido, ou seja os dados constantes do seu processo clínico serão fornecidos ao investigador, mas sem qualquer identificação, ou qualquer informação que permita saber a quem pertencem.

A descodificação apenas poderá ser efetuada pelo médico (que será o responsável pela base de dados, de acordo com a informação fornecida à Comissão Nacional de Proteção de Dados - CNPD), em caso de absoluta necessidade, por motivos de saúde do dador e, a pedido deste, e sempre de acordo com as disposições legais em vigor.

Os dados serão tratados confidencialmente, de acordo com a Lei, com os regulamentos e de acordo com as normas éticas aprovadas pela Comissão de Ética da Universidade Católica Portuguesa.

Os dados resultantes dos estudos realizados serão alvo de publicação de uma forma anónima e agregada, em termos de percentagens ou de dados numéricos, nunca individualmente.

#### Tempo de conservação

As amostras serão conservadas por um período de 20 anos no Biobanco do Instituto de Medicina Molecular (IMM), sob a responsabilidade da Equipa ligada ao SalivaTec, enquanto este estiver devidamente credenciado pelas entidades competentes. As coleções de amostras serão avaliadas periodicamente, nomeadamente para aferir da sua qualidade, podendo ser destruídas ou, findo o período da conservação, poder-se-á solicitar a prorrogação da conservação. Nestas condições excecionais o SalivaTec poderá voltar a contactar os dadores.

#### Comunicação e divulgação de dados

Os dados genéticos e as amostras biológicas colhidas para fins de investigação científica podem ser transferidos para outras organizações ou centros de investigação, para fins de pesquisa e somente

em projetos desenvolvidos conjuntamente com o SalivaTec, mediante consentimento do participante expresso na declaração de consentimento informado.

#### Possíveis Benefícios para os Participantes

Esta é uma doação altruísta, não havendo por isso qualquer compensação para o dador. Não se garante que este estudo envolva quaisquer benefícios diretos para o participante. Se algum dos estudos puder ser relevante para a saúde do dador, este será informado, se essa for a sua vontade expressa na declaração de consentimento informado. Contudo, a sua participação proporcionará a aquisição de conhecimentos que poderão vir a beneficiá-lo a si ou a terceiros no futuro.

#### Riscos físicos previsíveis

Na maioria dos casos, os riscos e o desconforto associados serão mínimos ou inexistentes. Nas colheitas associadas a procedimentos com fins diagnósticos ou terapêuticos, os riscos e o desconforto serão os inerentes ao procedimento em si. Em qualquer dos casos, o dador será sempre antecipadamente informado dos riscos e grau de desconforto associados aos procedimentos.

#### Participação Voluntária e Direitos de Abandono

O presumível dador terá toda a liberdade para se recusar a participar no estudo ou retirar o seu consentimento, suspendendo a participação em qualquer momento e, conseqüentemente, as amostras serão destruídas. A participação é voluntária e a sua recusa em participar não envolverá qualquer penalização ou perda de benefícios. A recusa ou abandono não colocarão em risco o direito a receber tratamento ou assistência médica, presentemente ou no futuro.

O dador poderá retirar o seu consentimento nas modalidades **sem contacto futuro** (as amostras poderão ser usadas normalmente até se esgotarem, mas não serão estabelecidos futuros contactos para a obtenção de mais amostras) ou **sem uso futuro** (não serão estabelecidos futuros contactos e as amostras serão imediatamente destruídas e os registos eliminados).

Se tiver qualquer dúvida, em qualquer momento, mesmo após a colheita, sobre este estudo poderá contactar a Diretora do SalivaTec: Prof. Doutora Marlene Barros, dirigindo-se a:

SalivaTec

Departamento de Ciências da

Saúde Universidade Católica

Portuguesa

Tel. +351232419500 - Fax +351232428344

E-mail: [mbarros@crb.ucp.pt](mailto:mbarros@crb.ucp.pt)

Banco de amostras biológicas para fins de investigação biomédica

Investigador: \_\_\_\_\_ Local de recolha: \_\_\_\_\_

Nome do dador: \_\_\_\_\_

Número de estudo do dador: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do bilhete de

identidade/cartão do cidadão n.º [ \_\_\_\_\_ ], declaro ter tomado conhecimento e aceitar participar neste projeto, de forma a contribuir para a criação de um banco de amostras biológicas com informação clínica associada, para fins de investigação biomédica.

Aceito que a minha amostra biológica seja utilizada em projetos de investigação de mecanismos das doenças, diagnóstico precoce, fatores de prognóstico e novos alvos terapêuticos em múltiplas áreas da medicina. Poderei revogar a autorização para utilização da minha amostra biológica e informação clínica em qualquer altura. O objetivo do banco de amostras biológicas foi-me claramente explicado e foi-me dada a oportunidade de colocar questões sobre o seu funcionamento, bem como os procedimentos relativos à colheita e utilização da minha amostra biológica e dados a ela associados.

Declaro que aceito participar, voluntariamente, neste estudo. Especificamente concordo com os seguintes pontos:

Consinto a colheita de material biológico (saliva / ..... / .....) e autorizo a

conservação de amostras no Biobanco, de modo a que possam ser usados para pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos por investigadores portugueses e estrangeiros, sem fins lucrativos;

Sim  Não

**Esta opção é para ser respondida apenas por participantes que já cederam amostras biológicas colhidas no âmbito de outros projetos.** Nestas circunstâncias, autorizo a transferência para o Biobanco das minhas amostras biológicas, previamente colhidas no âmbito de outros projetos, de modo que elas possam ser utilizadas em pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos por investigadores portugueses e estrangeiros, mas sem fins lucrativos;

Sim  Não

Estou consciente de que a minha participação é voluntária e que posso em qualquer altura solicitar a destruição das minhas amostras biológicas, invalidando assim o consentimento informado prévio, sem justificar, tendo recebido a garantia de que o meu pedido não desenvolverá discriminação;

Sim  Não

Declaro que quero conhecer resultados que possam ser relevantes para a minha saúde.

Sim  Não

Autorizo ser contactado novamente pelo Biobanco para pedido de atualização sobre a minha situação clínica;

Sim  Não

Autorizo o contactado do Biobanco a familiares meus para pedido autorização de colheita de amostras biológicas e/ou informação clínica;

Sim  Não

---

Data

Assinatura do Dador/Representante Legal

Em caso de representante legal, este atua na qualidade de:

- Titular do poder paternal, quando o dador é menor
- Tutor, quando o dador foi declarado interdito
- Herdeiro, quando o dador faleceu

Discuti este estudo de investigação com o participante e/ou o seu representante legal, utilizando uma linguagem compreensível e apropriada. Informei adequadamente o participante sobre a natureza deste estudo e sobre os seus possíveis benefícios e riscos, considerando que o participante compreendeu a minha explicação.

---

Data

Nome do Investigador/ Médico

Assinatura do Investigador/ Médico

Foi entregue um duplicado deste documento ao doente/representante legal.

## Anexo 2: Questionário aos participantes

### Questionário de Dadores

1.1. Data de Nascimento \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

1.2. Género

- Feminino
- Masculino

1.3. Dados Biométricos

Altura \_\_\_\_\_ (cm)      Peso \_\_\_\_\_ (Kg)      Perímetro Abdominal \_\_\_\_\_  
(cm)

1.4. Etnia

- Caucasiana
- Negra
- Asiática
- Cigana
- Outra \_\_\_\_\_

1.5. Área de Residência

- Aldeia
- Vila
- Cidade

1.6. Estado Civil

- Solteiro
- Casado
- Vive maritalmente
- Viúvo
- Divorciado

1.7. Nível de Escolaridade

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

1.8. Profissão

---

2.1 Fuma ou já fumou?

- Sim
- Não
- Ex-fumador

2.2 Se é ex-fumador, há quantos anos deixou de fumar? \_\_\_\_\_ anos

2.3 Se sim:

Com que idade começou a fumar? \_\_\_\_\_ anos

Quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_\_\_ cigarros/dia

3.1 Bebe bebidas alcoólicas?

- Sim
- Não

Se sim, com que idade começou a beber? \_\_\_\_\_ anos

Frequência do consumo de álcool:

- Ocasionalmente
- Semanalmente
- Socialmente
- Diariamente

3.2 Frequência do consumo de álcool:

\_\_\_\_\_ Nº de copos de vinho / semana

\_\_\_\_\_ Nº de cervejas / semana

\_\_\_\_\_ Nº de digestivos / semana

3.3 Deixou de beber?

Sim

Não

3.4 Se sim, há quantos anos? \_\_\_\_\_ anos

4.1 Grupo Sanguíneo

A

B

AB

O

Rh+

Rh-

Não Sabe

4.2 Toma regularmente medicamentos?

Sim

Não

4.2.1 Se sim, refira-se: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4.3 Tomou alguma medicação que não seja indicada acima nos últimos 30 dias?

- Sim
- Não

4.3.1 Se sim, refira-a:

---

---

---

4.4 Tomou algum antibiótico nos últimos 3 meses?

- Sim
- Não

4.4.1 Se sim, refira-o:

4.5 Tomou corticosteroides nos últimos 30 dias?

- Sim
- Não

4.6 Tomou bifosfonatos nos últimos 30 dias?

- Sim
- Não

4.7 Fez a vacina da gripe na última época Outono/Inverno?

- Sim
- Não

4.8 Está grávida?

- Homem
- Sim
- Não

4.8.1 Se sim, de quantos meses? \_\_\_\_\_ meses

4.9 Encontra-se na menopausa?

- Sim
- Não

4.9.1 Se sim, há quanto tempo? \_\_\_\_\_

4.10 Há quanto tempo teve a última menstruação? \_\_\_\_\_

4.11 Toma anticoncepcionais?

Sim

Não

4.11.1 Se sim, qual? \_\_\_\_\_

4.12 Nos últimos 12 meses foi consultado por um médico?

Sim

Não

4.12.1 Se sim, em que especialidade? \_\_\_\_\_

4.13 Qual a data das últimas análises que efetuou? \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

4.13.1 Foram encontrados valores anormais?

Sim

Não

4.13.1.1 Se sim, quais?

\_\_\_\_\_

---

4.14. Tem hipertensão?

- Sim
- Não

4.15 Atualmente sofre de alguma enfermidade?

- Sim
- Não

4.15.1 Se sim, qual?

---

4.15.2 Problemas Cardíacos

- Doenças das artérias coronárias
- Angina
- Arritmias
- Insuficiência cardíaca
- Ataque cardíaco
- Aneurisma da aorta
- Doença cardíaca congênita
- Doença cardíaca reumática
- Outra
- Não tenho

4.15.3 Diabetes

- Tipo 1
- Tipo 2
- Não tenho

<b>Análise Clínica</b>	<b>Valores</b>
Colesterol	
Glicose	
Resistência à insulina	
Hemoglobina glicosilada	
AGEs	
HDL	
LDL	
Trigliceridos	

#### 4.15.4 Doenças auto-imunes:

- Doença de Crohn
- Doença de Graves
- Doença de Behçet
- Síndrome de Sjogren
- Outra
- Não tenho

Doenças de sangue. Quais?

---

Doenças infeto-contagiosas. Quais?

---

Doenças de fígado. Quais?

---

Doenças de estômago. Quais?

---

Doenças Renais. Quais?

---

Epilepsia

Asma

Urticária

Sinusite

Acne

Outra

---

Não tenho

#### 4.16 É alérgico a algum medicamento ou dispositivo médico?

Sim

Não

4.16.1 Se sim, qual?

---

#### 4.17 É alérgico a algum alimento?

Sim

Não

4.17.1 Se sim, qual?

---

#### 4.18 É alérgico a picadas de insetos?

- Sim
- Não

4.18.1 Se sim, quais?

---

4.19 Foi sujeito a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?

- Sim
- Não

4.19.1 Se sim, há quanto tempo? -

---

4.20 História Familiar - Existem doenças na família como?

- Doenças Cardíacas
- Diabetes
- Cancro
- Não sabe
- Outras

### Questionário Alimentação

- 5.1. Utiliza azeite como principal gordura culinária? **Sim (1) Não (2)**
- 5.2. Usa mais de 4 colheres de sopa de azeite por dia? Considere fritar, temperar saladas, refeições fora de casa, etc.). **Sim (1) Não (2)**
- 5.3. Come mais de 200g (1 porção) de hortícolas por dia? **Sim (1) Não (2)**
- 5.4. Come mais de 3 peças de fruta por dia (considere um sumo natural como uma peça de fruta. **Sim (1) Não (2)**
- 5.5. Come menos que uma porção de carne vermelha por dia? Considerar 100-150g de carne ou produtos como presunto, salsicha, fiambre, etc. **Sim (1) Não (2)**
- 5.6. Come menos que 12g de manteiga, margarina ou natas por dia? **Sim (1) Não (2)**
- 5.7. Bebe menos que 1 bebida açucarada ou gaseificada por dia? **Sim (1) Não (2)**
- 5.8. Bebe mais que 7 copos de vinho por semana? **Sim (1) Não (2)**

- 5.9. Come leguminosas (favas, lentilhas, feijão ervilha, etc.) mais que 3 porções por semana? **Sim (1) Não (2)**
- 5.10. Come 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 (1) Não (2)**
- 5.11. Come bolos ou outros produtos de pastelaria (biscoitos, bolachas, etc.) menos de 3 vezes por semana? **Sim (1) Não (2)**
- 5.12. Come oleaginosas mais de 3 vezes (nozes, amêndoas, amendoins) por semana? **Sim (1) Não (2)**
- 5.13. Come preferencialmente frango, peru ou coelho em vez de vaca, porco ou salsichas? **Sim (1) Não (2)**
- 5.14. 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 (1) Não (2)**

Geriatric Oral Health Assessment Index (GOHAI)

Q1 Nos últimos 3 meses diminuiu a quantidade de alimentos ou mudou o tipo de alimentação por causa dos seus dentes?

**Sempre Algumas vezes Nunca**

Q2 Nos últimos 3 meses teve problemas para mastigar alimentos?

**Sempre Algumas vezes Nunca**

Q3 Nos últimos 3 meses teve dor ou desconforto para engolir alimentos?

**Sempre Algumas vezes Nunca**

Q4 Nos últimos 3 meses mudou o seu modo de falar por causa dos problemas da sua boca?

**Sempre Algumas vezes Nunca**

Q5 Nos últimos 3 meses sentiu algum desconforto ao comer algum alimento?

**Sempre      Algumas vezes      Nunca**

Q6 Nos últimos 3 meses deixou de se encontrar com outras pessoas por causa da sua boca?

**Sempre      Algumas vezes      Nunca**

Q7 Nos últimos 3 meses sentiu-se satisfeito ou feliz com a aparência da sua boca?

**Sempre      Algumas vezes      Nunca**

Q8 Nos últimos 3 meses teve que tomar medicamentos para passar a dor ou o desconforto da sua boca?

**Sempre      Algumas vezes      Nunca**

Q9 Nos últimos 3 meses teve algum problema na sua boca que o deixou preocupado?

**Sempre      Algumas vezes      Nunca**

Q10 Nos últimos 3 meses chegou a sentir-se nervoso por causa dos problemas na sua boca?

**Sempre      Algumas vezes      Nunca**

Q11 Nos últimos 3 meses evitou comer junto de outras pessoas por causa de problemas na boca?

**Sempre      Algumas vezes      Nunca**

Q12 Nos últimos 3 meses sentiu os seus dentes ou gengivas ficarem sensíveis a alimentos ou líquidos?

**Sempre      Algumas vezes      Nunca**

-----PARE AQUI-----  
 -----

### Status Dentário e Higiene Oral

#### 6.1 Índice CPO

Code	Criteria
0	Healthy
1	Cariou lesion
2	Filled cavities with carie
3	Filled cavities without carie
4	Lost tooth by carie
5	Lost tooth (by other reason)
6	Sealant
7	Prosthesis or implant
8	Not erupted
T	Trauma
9	Not registered

			55	54	53	52	51	61	62	63	64	65			
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
			85	84	83	82	81	71	72	73	74	45			

C \_\_\_ P \_\_\_ O \_\_\_ = \_\_\_\_\_

6.2 Índice de Higiene Oral - Total \_\_\_\_\_ (%)

### 6.3 Periodontal Screening Record (PSR)

1°Q	2°Q	3°Q
6°Q	5°Q	4°Q

Sangramento à sondagem (BOP): \_\_\_\_\_%

6.4

Diagnóstico

Periodontal:

---

Score	Criteria
0	Periodontal health
1	Bleeding on probe (BOP)
2	Dental calculus detected during probing, iatrogenic margin and/or BOP
3	Periodontal pocket 3,5-5.5 mm
4	Periodontal pocket 6 mm or more
*	Periodontal abnormalities present (furcation involvement, tooth mobility, gingival recession, muco-gingival problems)

Observações:

