



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA | INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

OS MICROORGANISMOS ORAIS E O ORALOMA DA DIABETES MELITOS TIPO 2

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

Por

Patrícia Maria Iria Moreira

Viseu, 2013



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA | INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

OS MICROORGANISMOS ORAIS E O ORALOMA DA DIABETES MELITOS TIPO 2

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

Por

Patrícia Maria Iria Moreira

Sob a orientação do Professor Doutor Nuno Rosa e a co-orientação da
Professora Doutora Maria José Correia

Viseu, 2013

Aos meus pais pelo amor incondicional e apoio em todas as minhas escolhas e
decisões.

Às minhas irmãs por serem o meu porto seguro, a minha bússola e a maior fonte de carinho e força nos momentos mais difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Nuno Rosa,

orientador desta dissertação, pela disponibilidade, apoio, partilha do saber, por ter sempre acreditado em mim e no meu potencial e pelo constante estímulo para não desistir.

À Professora Doutora Maria José Correia,

pela dedicação e decisiva contribuição na execução e moldagem de toda esta dissertação.

À Professora Doutora Marlene Barros,

pelos seus comentários e levantamento de questões sempre tão pertinentes .

Aos meus sobrinhos,

por me proporcionarem momentos tão puros de felicidade.

Aos meus amigos,

pela amizade, companheirismo e apoio e por se manterem presentes na minha vida ao fim de tantos anos, suportando as minhas ausências.

Aos amigos

que fiz durante os anos de faculdade, que tornaram estes últimos cinco anos, os melhores da minha vida.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Resumo

Os estudos experimentais no âmbito da proteómica de tecidos orais fornecem-nos dados que permitem compreender os mecanismos moleculares, os perfis de expressão proteica, a sua regulação, a presença de modificações pós-tradução e as vias de sinalização modificadas na Diabetes Melitos tipo 2.

O presente trabalho tem como objetivo verificar a relação das proteínas microbianas existentes na cavidade oral de pacientes com Diabetes Melitos tipo 2 com o estado de glicosilação das proteínas salivares humanas e a sua relação com a etiologia desta doença e das suas complicações.

A catalogação das proteínas orais alteradas no paciente diabético tipo 2 permitiu adicionar 39 proteínas à base de dados do OralCard. A caracterização funcional do Oraloma da DMT2 permitiu identificar alterações estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em determinadas vias de sinalização, processos biológicos e funções moleculares das proteínas orais da DMT2. No que concerne ao microbioma oral da DMT2, verificou-se escassez de estudos experimentais dirigidos para a sua identificação. No entanto, a partir dos estudos disponíveis foi possível identificar a *Candida glabrata* e a *Candida tropicalis* exclusivamente na diabetes, em determinados *habitats*. A análise interactómica realizada permitiu verificar que existe um elevado número de proteínas microbianas que interagem com um relativamente reduzido número de proteínas orais humanas, sendo que a fibronectina é a proteína humana da DMT2 que possui a maior rede de interações com proteínas produzidas por microrganismos orais. O género em que existe maior produção de proteínas que interagem com proteínas humanas da DMT2 é *Streptococcus*.

Esta análise do proteoma oral poderá permitir o estabelecimento de alvos para futuros estudos experimentais, identificar novas formas de intervenção clínica na Diabetes ou compreender os mecanismos moleculares que levam às complicações orais e sistémicas desta doença.

Palavras-chave: Diabetes Melitos Tipo 2, glicosilação bacteriana, proteoma salivar, microbioma oral, OralCard

Abstract

Experimental studies of oral tissue proteomics originate data that enlighten the molecular mechanisms, protein expression profiles, regulation, the presence of post-translation modifications and altered pathways in Type 2 Diabetes Mellitus.

This paper aims to verify the relationship between microbial proteins in the oral cavity of type 2 diabetic patients and the glycosylation of salivary proteins and its relation with the disease's etiology and complications.

The study of altered proteins in the type 2 diabetic patient allowed the identification of 39 proteins which were added to the OralCard's database. The functional characterization of the type 2 diabetes Oraloma allowed the detection of statistical significant changes ($p \leq 0,05$) in certain pathways, biological processes and molecular functions in the oral proteins of type 2 diabetes. There is a shortage of experimental directed studies to enable the identification of the oral microbiome of type 2 diabetes. However with the available studies it was possible to show that *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* were identified exclusively in certain habitats of the oral cavity of diabetes. The interactomic analysis carried out has shown that there is an elevated number of microbial proteins interacting with a relatively small number of human oral proteins, of which fibronectin is the human protein of type 2 diabetes with the largest interaction network with the oral microbial proteins. The genus that produces the largest number of proteins that interact with the human proteins of type 2 Diabetes is *Streptococcus*.

This analysis of the oral proteome allows the establishment of new targets for experimental studies, the identification of new clinical ways to intervene in type 2 diabetes mellitus or the understanding of the molecular mechanisms that lead to the oral and systemic complications of the disease.

Key-Words: Type 2 Diabetes Mellitus, bacterial glycosylation, salivary proteome, oral microbiome, OralCard

Nota prévia

Ao longo desta dissertação aparecem, por vezes, expressões em língua Inglesa, escritas em itálico, por exemplo, os termos de classificação de ontologias. Estas surgem da necessidade de uniformização global dos termos usados para descrever conceitos biológicos, entre culturas e línguas diferentes. A tradução destas expressões poderia implicar a distorção do seu significado original e a alteração do conceito biológico que se pretende identificar.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	- 1 -
1.1 Diabetes Melitos	- 1 -
1.1.1 Conceito e epidemiologia	- 1 -
1.1.2 Classificação	- 2 -
1.1.3 Diagnóstico	- 2 -
1.1.4 Sintomas e Complicações	- 3 -
1.2 Diabetes Melitos tipo 2	- 4 -
1.2.1 Etiologia e Fisiopatologia	- 4 -
1.2.2 Fatores de risco	- 5 -
1.2.3 Complicações na cavidade oral	- 6 -
1.2.4 Diabetes Melitos e a Doença Periodontal	- 6 -
1.2.5 Diabetes Melitos e alterações nas glândulas salivares e saliva	- 9 -
1.2.6 Alteração no Microbioma oral da Diabetes Melitos	- 10 -
1.2.7 Diabetes Melitos e a tendência aumentada a infecções bucais	- 12 -
1.2.8 Diabetes Melitos e o atraso no processo de cicatrização	- 13 -
1.2.9 O Proteoma da Diabetes Melitos	- 14 -
1.3 Glicosilação Enzimática de Proteínas	- 16 -
1.4 Glicosilação Não Enzimática de Proteínas	- 18 -
1.5 A glicosilação e a resposta imune	- 19 -
2. OBJECTIVOS	- 23 -
3. MATERIAIS E MÉTODOS	- 25 -
4. RESSULTADOS E DISCUSSÃO	- 37 -
4.1 OralOma humano da DMT2	- 37 -
4.1.1 Composição	- 37 -
4.1.2 Relação com os estados de saúde/doença	- 40 -
4.1.3 Caracterização do dador da amostra	- 42 -
4.1.4 Métodos de amostragem e análise	- 43 -

4.1.5 Origem das proteínas orais da DMT2	- 44 -
4.1.6 Outras informações.....	- 45 -
4.1.7 Caracterização funcional.....	- 48 -
4.1.7.1 Vias de sinalização das proteínas orais da DMT2	- 48 -
4.1.7.2 Processos biológicos das proteínas orais da DMT2	- 52 -
4.1.7.3 Funções moleculares das proteínas salivares da DMT2.....	- 53 -
4.2 O supra-sistema oral na DMT2.....	- 57 -
4.2.1 Microbioma oral da DMT2.....	- 57 -
4.2.2 Interactoma microbioma-proteoma humano oral da DMT2	- 64 -
4.2.3 GlicoOraloma da DMT2	- 67 -
5. Conclusão	- 69 -
6. Bibliografia.....	- 71 -
7. Anexos	- 79 -

Índice de abreviaturas:

DM – Diabetes Melitos

OMS – Organização Mundial de Saúde

DMT2 – Diabetes Melitos tipo 2

DMT1 – Diabetes Melitos tipo 1

ADA – *American Diabetes Association*

NGSP - *National Glycohemoglobin Standardization Program*

DCCT - *Diabetes Control and Complications Trial*

AGE - produto avançado de glicosilação

RAGE – receptor de um produto avançado de glicosilação

MMPs – metaloproteinases da matriz

TNF – factor de necrose tumoral

ROS – espécies reactivas de oxigénio

PRRs - recetores de reconhecimento de padrões

GBPs - proteínas que se ligam aos glicanos

SIGLECS - sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins

PANTHER - *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*

IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

PPIs - interacções proteína-proteína

PMN - polimorfonucleares

Índice de Figuras:

Figura 1 – Distribuição de espécies bacterianas mais frequentemente identificadas nos diferentes nichos ecológicos da cavidade oral. Adaptado de Mager <i>et al</i> 2003 (22)	- 11 -
Figura 2 – Cabeçalhos que permitem a organização da informação recolhida dos diferentes estudos de proteómica da cavidade oral (proteínas salivares da DMT2 anotadas manualmente) numa tabela em Microsoft Excel 2010	- 26 -
Figura 3 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 relativa à origem das proteínas da DMT2 anotadas manualmente	- 26 -
Figura 4 – Visualização da ferramenta Diagrama de Venn após a inserção dos dados das quatro listas a intersectar	- 27 -
Figura 5 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente à relação das proteínas anotadas da DMT2 com os estados de saúde e doença	- 27 -
Figura 6 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente à caracterização do dador da amostra de saliva	- 28 -
Figura 7 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente aos métodos de amostragem e análise das proteínas salivares da DMT2	- 29 -
Figura 8 - Sistema de análise em grupo da ferramenta de classificação do PANTHER. As opções seleccionadas correspondem às definições utilizadas para analisar os conjuntos de proteínas anotados na DMT2	- 30 -
Figura 9 – Seleção do tipo de classificação por ontologia desejado, na ferramenta PANTHER.....	- 31 -
Figura 10 - Página de rosto da base de dados do UniprotKB	- 33 -
Figura 11 - Ferramenta <i>search</i> da base de dados do UniprotKB	- 33 -
Figura 12 - Ferramenta <i>retrieve</i> da base de dados do UniprotKB	- 34 -
Figura 13 - Diagrama de Venn representativo da distribuição das proteínas salivares segundo a sua origem.....	- 45 -
Figura 14 - Tabela indicativa dos biomarcadores orais sobre regulados em pacientes com DMT2, sugeridos por Border <i>et al</i> (2012)	- 46 -
Figura 15 - Tabela indicativa dos biomarcadores orais sub regulados em pacientes com DMT2, sugeridos por Border <i>et al</i> (2012)	- 46 -

Figura 16 - Tabela indicativa dos biomarcadores orais sub regulados em pacientes com DMT2, sugeridos por Border et al (2012) e por outros autores ... -	47 -
Figura 17 - Distribuição das proteínas identificadas em pacientes com DMT2 segundo as vias de sinalização em que participam, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003). É mostrada a diferença fraccional entre as proteínas de DMT2 e o OralOma normal. A amarelo estão indicadas as vias de sinalização com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$).....	- 49 -
Figura 18 - Distribuição das proteínas salivares de pacientes com DMT2 segundo os processos biológicos em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003) . É mostrada a diferença fraccional entre as proteínas de DMT2 e o OralOma normal. A laranja estão indicados os processos biológicos com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$).	- 52 -
Figura 19 - Distribuição das proteínas salivares de pacientes com DMT2 segundo as funções moleculares que desempenham, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003). É mostrada a diferença fraccional entre as proteínas de DMT2 e o OralOma normal. A laranja estão indicadas as funções moleculares com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$).....	- 54 -
Figura 20 - Gráfico representativo da distribuição das proteínas de DMT2 anotadas no nível 1 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER como tendo função catalítica.	- 56 -
Figura 21 - Gráfico representativo da distribuição das proteínas de DMT2 anotadas no nível 2 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER como tendo função de hidrolase.	- 56 -
Figura 22 - Número de proteínas com E.C. Number 2.4 e 3.2 identificadas nos estudos que identificaram o microbioma da DMT2	- 63 -
Figura 23 - Interações das proteínas orais da DMT2 (círculo mais à direita) com as proteínas bacterianas orais (círculo mais à esquerda), gerada através do algoritmo Orallnt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape	- 65 -

Figura 24 – Géneros dos microrganismos orais que produzem um maior número de proteínas que interagem com proteínas orais humanas da DMT2.... - 66 -

Figura 25 - Diagrama de Venn representativo da intersecção da lista correspondente às proteínas orais glicosiladas presentes na cavidade oral (fonte OralCard) e da lista das proteínas orais da DMT2 - 67 -

Índice de tabelas:

Tabela 1- Proteínas salivares identificadas nos tecidos orais da DMT2 ___ - 37 -

Tabela 2 – Prevalência de microrganismos encontrados nos tecidos orais do paciente com Diabetes Melitos tipo 2, comparativamente a controlos sem DMT2, resultantes da análise dos resultados de estudos experimentais___ - 57 -

Tabela 3 - Proteínas bacterianas orais com capacidade glicosídica (glicosiltransferase – coloração a azul ou glicosidase – coloração a rosa) e que interagem com proteínas humanas orais da DMT2 _____ - 68 -

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Melitos

1.1.1 Conceito e epidemiologia

A Diabetes Melitos (DM) é uma doença metabólica multifactorial caracterizada por um estado de hiperglicemia crónico e por distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, resultantes de defeitos na secreção/ação da insulina ou ambos (1-3).

De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em Setembro de 2012, existiam cerca de 347 milhões de pessoas no mundo com Diabetes, sendo que aproximadamente 90 a 95% destes indivíduos afetados têm uma forma da patologia classificada como Diabetes melitos tipo 2 (DMT2) (2). Estima-se que, em 2030, o número de pessoas afetadas pela Diabetes Melitos ascenda a 438 milhões de pessoas (3).

Em 2010, a prevalência da Diabetes, em Portugal, era de 12,4% da população, afetando indivíduos com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, o que corresponde a um total de aproximadamente 991 mil indivíduos. Desde o ano 2000 que se assiste a um crescimento do número de novos casos diagnosticados anualmente em Portugal, sendo que em 2010, foram detetados 623 novos casos de Diabetes por cada 100 000 habitantes (4).

A incidência desta patologia está a aumentar exponencialmente, à escala mundial, essencialmente pelo aumento populacional, envelhecimento, urbanização, aumento da prevalência da obesidade, associada a uma inatividade física e a dietas com altos valores de açúcares e lípidos (1, 2, 5). Esta patologia constitui um sério problema de saúde pública, uma vez que requer cuidados de saúde vitalícios, podendo potenciar a morte prematura e permanecendo incurável até aos dias de hoje (3).

1.1.2 Classificação

A classificação da Diabetes, preconizada pela *American Diabetes Association* (ADA) e pela OMS, combina os estágios clínicos de hiperglicemia e a etiologia da DMT2 (6). A vasta maioria dos casos de Diabetes Melitos está inserida nas duas categorias *major* da patologia, designadas como tipo 1 (DMT1) e tipo 2 (DMT2).

Ao invés da DMT1 em que ocorre uma destruição autoimune das células β pancreáticas (resistência absoluta), na DMT2, existe uma combinação de resistência relativa à ação da insulina e de defeitos na sua secreção (disfunção das células β). Existem ainda outras duas categorias: Diabetes melitos gestacional e uma outra categoria que inclui tipos mais específicos de DM (defeitos genéticos da função das células β ; defeitos genéticos da ação da insulina; doenças endócrinas do pâncreas; induzidas por fármacos ou químicos; induzidas por infecções; e síndromes genéticos associados à Diabetes) (2, 6).

1.1.3 Diagnóstico

Segundo a ADA (2012), os critérios instituídos para realizar o diagnóstico da Diabetes Melitos são os seguintes: (2)

- HbA1c (quantidade de hemoglobina glicosilada) $\geq 6.5\%$: o teste deve ser realizado num laboratório usando um método certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e standardizado pelo ensaio *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT);
ou
- Glicose plasmática em jejum ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l). O jejum é definido como a ausência de ingestão calórica durante pelo menos 8 horas;
ou
- Glicose plasmática de 2h ≥ 200 mg (11.1 mmol/l) durante o teste de tolerância à glicose: o teste deve ser realizado tal como foi descrito pela

OMS, usando uma carga de glicose que contenha o equivalente a 75g de glicose anidra dissolvida em água;

ou, por último,

- Glicose plasmática ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l): em um paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou em crise hiperglicêmica.

Actualmente, o diagnóstico da Diabetes Melitos é determinado exclusivamente pela avaliação dos níveis de glicose, não existindo ainda um método que avalie o enquadramento molecular e que caracterize a Diabetes e as suas complicações.

1.1.4 Sintomas e Complicações

A Diabetes Melitos é caracterizada pelo aumento dos níveis de glicose no sangue. Para combater este excesso de glicose, o pâncreas produz a insulina, hormona responsável pela abertura dos canais do músculo-esquelético para a entrada de glicose nas células. Nos casos em que existe resistência e/ou déficit de insulina, a glicose permanece no sangue em vez de entrar nas células alvo, desenvolvendo-se, assim, o estado hiperglicémico. O excesso de glicose é armazenado no fígado sob a forma de glicogénio, sendo que este órgão também é responsável pelo *clearance* da insulina (1).

Os sintomas clássicos da DM estão relacionados com o fenótipo hiperglicémico crónico e são a poliúria, a polidipsia, a perda de peso inexplicada, a perda de visão, cansaço e ocasionalmente a polifagia e a visão turva. Este estado hiperglicémico crónico pode ainda ser responsável pelo comprometimento do crescimento e aumento da suscetibilidade a determinadas infeções (2).

A hiperglicemia pode, ainda, ser considerada o fator potenciador das complicações mais frequentes associadas à DM: a retinopatia, a nefropatia, a neuropatia, doença cardiovascular, doença vascular periférica e periodontite (5, 7).

As consequências agudas da DM não controlada podem pôr em risco a vida dos indivíduos, nomeadamente se a hiperglicemia estiver aliada à cetoacidose ou o Síndrome diabético hiperosmolar hiperglicémico (2). Com

efeito, indivíduos com DM têm um risco aumentado de desenvolvimento de complicações a longo prazo (5).

1.2 Diabetes Melitos tipo 2

1.2.1 Etiologia e Fisiopatologia

A etiologia específica da DMT2 não é conhecida, no entanto, a maior parte dos pacientes diabéticos são obesos e a própria obesidade pode provocar ou agravar a resistência à insulina. Pacientes classificados como não obesos, pelo tradicional critério do peso corporal, normalmente possuem uma percentagem aumentada de massa corporal gorda, distribuída predominantemente pela região abdominal (2).

A DMT2 é precedida por um longo período de hiperglicemia assintomática que pode durar vários anos (6), daí que o diagnóstico para esta forma de diabetes não seja direto. Acontece, porém, que o paciente não denota imediatamente alguns dos sintomas clássicos da patologia (2). Neste estado de pré-diabetes, os níveis de glicose pós-pandriais estão ligeiramente aumentados, mas os níveis de glicose em jejum podem estar dentro dos padrões normais. Esta elevação dos níveis de glicose pós-pandriais é um dos critérios usados para definir a alteração da tolerância à glicose (IGT), um estado reversível não-específico. Cerca de 30% dos indivíduos com IGT progridem para Diabetes dentro de 10 anos. Em alguns indivíduos, as células β pancreáticas compensam esta resistência à insulina pelo aumento da sua secreção, sendo que nestes casos a patologia não se chega a desenvolver. No entanto, na maioria dos pré-diabéticos, os defeitos graduais na ação/secreção da insulina mantêm o estado constante de hiperglicemia. A resistência à insulina pode melhorar pela perda de peso e/ou tratamento farmacológico para a hiperglicemia, mas raramente volta ao normal. (2).

As células β pancreáticas têm a capacidade de avaliar os níveis de glicose de forma a adaptarem a secreção de insulina de acordo com a variação da sua concentração sanguínea. Como consequência da resistência à insulina, as células β pancreáticas produzem quantidades elevadas de insulina e o

estado de hiperinsulinemia compensatória vai mantendo os níveis de glicose dentro da normalidade. A DMT2 é caracterizada por uma perda progressiva da função das células β que culmina numa perda total da sua função. Quando a secreção compensatória de insulina não é suficiente e, por isso, falha, e a manutenção do equilíbrio na concentração sanguínea de glicose não é conseguida, um estado de hiperglicemia descompensado desenvolve-se. Uma vez estabelecido, este estado exerce um efeito deletério na secreção de insulina, pela toxicidade da glicose.

O desenvolvimento de DMT2 é um processo gradual e o seu estabelecimento e diagnóstico evidente ocorre quando as células β não conseguem compensar a resistência à insulina. Assim, os indivíduos possuem resistência relativa à insulina (8).

Normalmente estes indivíduos não necessitam de injeções de insulina para sobreviverem, o qual constitui um tratamento indispensável no caso dos pacientes com DMT1 (6). O desequilíbrio da homeostasia da glicose na DMT2 é maioritariamente devido a uma combinação de dois defeitos fisiológicos: a secreção debilitada de insulina e a diminuição da sensibilidade periférica e hepática à insulina (8).

1.2.2 Fatores de risco

A identificação de fatores de risco é essencial para o sucesso da implementação de programas de prevenção primária (6).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de Diabetes Melitos tipo 2 podem ser classificados como modificáveis e não modificáveis. Os primeiros são a obesidade, a falta de exercício físico, a abstinência de álcool, a dieta pobre em fibras, a dieta rica em gorduras saturadas. Os fatores de risco não modificáveis são a etnia, a idade, o sexo, os fatores genéticos, os antecedentes familiares de Diabetes Melitos tipo 2, a diabetes gestacional prévia, o baixo peso à nascença, o historial de dislipidemia e de hipertensão (6).

1.2.3 Complicações na cavidade oral

A Diabetes Melitos é uma desordem comum com manifestações sistêmicas e orais concomitantes com um grande impacto na saúde dos indivíduos. O estado de hiperglicemia crônico parece ser o fator etiológico destas alterações verificadas nos vasos sanguíneos, coração, rins, olhos, nervos e cavidade oral. As alterações orais incluem a doença periodontal (a mais prevalente na cavidade oral), disfunções salivares, xerostomia, alterações do paladar, síndrome da boca ardente, tendência aumentada para infecções orais (candidíase), cáries dentárias, líquen plano, atraso no processo de cicatrização e halitose (9, 10). A presença destas alterações na cavidade oral de indivíduos não é um fator patognomônico para o diagnóstico de Diabetes Melitos, uma vez que em indivíduos com a patologia controlada estas alterações são menos frequentes (11).

1.2.4 Diabetes Melitos e a Doença Periodontal

A doença periodontal surge por uma infecção bacteriana crônica, desencadeada no hospedeiro, que afeta os tecidos de suporte dos dentes (3, 10, 11).

O biofilme bacteriano que se forma na superfície dos dentes proporciona um estímulo bacteriano crônico que induz uma resposta inflamatória local nos tecidos gengivais. A lesão inflamatória incipiente (gengivite) é totalmente reversível e resolve-se após a disrupção mecânica do biofilme, conseguida por uma escovagem regular e eficaz. A acumulação, a longo prazo, de placa bacteriana no nicho dentogengival resulta num enriquecimento e maturação do biofilme e constante inflamação local. O sulco gengival que rodeia os dentes torna-se progressivamente mais profundo, formando uma bolsa periodontal (3). As bolsas periodontais são preenchidas por uma diversidade de microrganismos, presentes em elevadas concentrações, por toxinas por eles produzidas e por uma abundância de nutrientes resultantes da inflamação crônica (9). Com o agravamento da patologia, ocorre uma perda irreversível

das estruturas de suporte dos dentes (fibras de tecido conjuntivo, ligamento periodontal e osso alveolar), desenvolvendo-se assim a doença periodontal (3).

A associação entre a Diabetes e a doença periodontal tem sido relatada na literatura desde os anos 60. A Diabetes é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de periodontite e contribui para o aumento da prevalência, severidade e progressão da patologia (3, 12). A doença periodontal é considerada por muitos autores como a sexta complicação crônica mais prevalente da Diabetes (9, 12, 13). Em pacientes com Diabetes Mellito tipo 2, o risco de desenvolvimento de doença periodontal é 3 vezes maior do que na população geral não diabética (9). Indivíduos com diabetes melitos e indivíduos fumadores são mais suscetíveis à destruição do periodonto comparativamente com não diabéticos e não fumadores (11).

Vários mecanismos foram propostos para explicar o aumento da suscetibilidade de pacientes com DM não controlada a doenças periodontais, nomeadamente alterações na resposta do hospedeiro, metabolismo do colagénio e vascularidade. Indivíduos com DMT2 mal controlada apresentam uma resposta inflamatória exagerada à ação bacteriana. Esta resposta hiperinflamatória aliada a uma cicatrização e reparação tecidual debilitada pode exponenciar ainda mais a reação inflamatória e a destruição dos tecidos periodontais, nestes pacientes (10).

A hiperglicemia crônica resulta na formação e acumulação de produtos avançados de glicosilação (AGEs), resultantes da glicosilação não enzimática, nos tecidos de pacientes com diabetes melitos (14, 15). Não existem evidências que relacionem esta formação de AGEs através de processos de glicosilação enzimática realizada pelos microrganismos orais. No periodonto, ambiente rico em glicose nos diabéticos, os fibroblastos, células de reparação primária, não conseguem reparar o colagénio danificado pela ligação dos AGEs aos seus recetores (RAGE), diminuindo-se a capacidade de cicatrização dos tecidos. Também no periodonto, os AGEs causam reabsorção óssea e quebram as ligações das fibras de colagénio, levando à perda de inserção e mobilidade dentária (14). O declínio da função dos leucócitos polimorfonucleares aliado às alterações no metabolismo do cálcio e à formação de AGEs afetam negativamente a estabilidade do colagénio e a integridade vascular (9). A expressão aumentada de (RAGE) e de marcadores de *stress*

oxidativo, foi demonstrada nos tecidos gengivais de pacientes com diabetes melitos e periodontite (3).

A interação hospedeiro-microbioma nos tecidos periodontais resulta na libertação de metaloproteinases da matriz (MMPs), fator de necrose tumoral (TNF) e na formação de *stress* oxidativo, aumentando a suscetibilidade à destruição tecidular. A diabetes por si só é uma condição pró-inflamatória, mas a presença de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigénio (ROS) agrava a inflamação característica da periodontite (14). Assim, a ação dos microrganismos num ambiente com expressão aumentada de RAGE, como o periodonto de um indivíduo com diabetes melitos, promove o aumento da inflamação e uma diminuição da reparação tecidular, o que resulta numa acelerada e severa destruição do periodonto (3).

O estado de inflamação crónica induzido pela periodontite pode contribuir para a resistência à insulina e o agravamento do controlo glicémico (10, 12, 16). Evidências sugerem que a bacteremia induzida pela periodontite pode causar um aumento das citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigénio levando à etiopatogénese do síndrome metabólico e aumento da resistência à insulina (3, 10). Uma meta-análise desenvolvida por Engebretson e Kocher, em 2013, concluiu que a terapia periodontal parece melhorar os parâmetros metabólicos, pela avaliação do HbA1c, dos pacientes com DM (17). Resultados de inúmeros estudos desenvolvidos nos últimos dois anos corroboraram a noção de que a terapia periodontal pode reduzir os mediadores inflamatórios circulantes, como a proteína C-reativa, TNF, IL-6 e fibrinogénio, e aumentar os níveis de adiponectina em indivíduos com diabetes melitos (3).

A Diabetes melitos e a periodontite são duas patologias crónicas interligadas: indivíduos diabéticos têm uma maior suscetibilidade a desenvolver periodontite e a periodontite tem um efeito negativo no controlo glicémico (12, 16).

O papel do Médico Dentista deve ser ativo: este deve ter pleno conhecimento dos mecanismos moleculares associados a estas duas patologias de forma a poder alertar os pacientes para a importância da manutenção e melhoria da higiene e saúde oral e controlo dos níveis de glicose.

1.2.5 Diabetes Melitos e alterações nas glândulas salivares e saliva

A Diabetes Melitos é considerada um dos fatores etiológicos da sialose, uma patologia multifatorial das glândulas salivares, caracterizada por um crescimento bilateral, indolor, que afeta maioritariamente as glândulas parótidas (9, 18). A sialose, nos diabéticos, não é considerada uma patologia neoplásica, nem tumoral, mas degenerativa. Está associada a uma alteração da neuroregulação glandular autónoma provocada por uma desmielinização e atrofia das células mioepiteliais (18). O aumento de volume das glândulas ocorre por infiltração adiposa do parênquima ou por hipertrofia acinar (18). Este crescimento geralmente promove uma diminuição da produção de saliva, daí que muitas vezes, os pacientes diabéticos refiram possuir a boca seca (xerostomia). A xerostomia está geralmente associada a uma diminuição da produção de saliva e é referida por cerca de 10 a 30% dos pacientes diabéticos. Esta hiposalivação pode causar glossodinia, úlceras, queilite, língua fissurada, língua saburrosa, perdas dentárias, e perda da capacidade da aderência das próteses, que por sua vez promove o trauma dos tecidos moles, a tendência a infeções orais (candidíase), a halitose, o aumento da concentração de mucinas e glicose, a produção/ação debilitada de muitos agentes antimicrobianos, a ausência de *gustin*, proteína responsável pela constante maturação das papilas gustativas, e a proliferação de microrganismos patogénicos (9).

Além da diminuição do fluxo salivar, também foram descritas alterações bioquímicas na saliva de pacientes com Diabetes Melitos (18). Estas alterações estão relacionadas com a concentração da glicose, níveis totais de proteínas, níveis de proteínas específicas (albumina, lisozimas, peroxidase, amilase, IgA) electrólitos (sódio, potássio, cloro, fósforo, magnésio e cálcio) e capacidade tampão (9). Um estudo experimental desenvolvido por Jurysta *et al* (2009) comparou a concentração de glicose na saliva de pacientes com diabetes e controlos saudáveis sem diabetes e concluiu que a concentração de glicose na saliva é maior em pacientes diabéticos (19). Os resultados de um estudo desenvolvido por Pacheco *et al* (2005) com o objetivo de identificar as mudanças que ocorrem no fluxo salivar e na composição na saliva de

diabéticos tipo 1 e tipo 2, ambos comparados com controlos saudáveis, indicam que os pacientes com diabetes tipo 1 apresentam alterações nos níveis de fosfato enquanto os pacientes com diabetes tipo 2 possuem alterações do fluxo salivar e concentrações de cálcio (9).

1.2.6 Alteração no Microbioma oral da Diabetes Melitos

A cavidade oral está extensamente colonizada por microorganismos, o que inclui vírus, protozoários, fungos, *archaea* e bactérias, com comunidades bacterianas altamente complexas, constituídas por cerca de 1000 espécies. Contrariamente ao microbiota comensal encontrado nos outros locais do corpo humano, que vivem tipicamente em harmonia com o hospedeiro, o microbiota normal da boca é responsável pelas duas doenças mais comuns do homem: a cárie e a doença periodontal. A simples presença de um microbiota oral, presente em quase todas as superfícies da cavidade oral, inibe a colonização por patógenos, fenómeno designado resistência à colonização. A importância deste efeito pode ser verificada, uma vez que a disrupção do microbiota comensal pela ação de, por exemplo, agentes antimicrobianos, permite o aparecimento de infeções oportunistas, por exemplo, por espécies de *Candida* e *Staphylococcus aureus* (20).

A cavidade oral inclui vários *habitats* microbianos, nomeadamente os dentes, o sulco gengival/bolsa periodontal, gengiva aderida, língua, bochecha, lábio, palato duro e palato mole. Contiguamente à cavidade oral estão as tonsilas, faringe, esófago, tubo de Eustáquio, ouvido médio, traqueia, pulmões, sinos e cavidades nasais. O microbioma oral humano é definido como o conjunto de todos os microrganismos que podem ser encontrados na cavidade oral humana e nas extensões contíguas (terminam no esófago distal) (21). A figura que se segue fornece alguns exemplos de espécies frequentemente identificadas nos diferentes nichos ecológicos da cavidade oral (Figura 1).

Nicho da cavidade bucal	Gêneros mais comuns	Espécies em maior proporção
Placa dental supragengival	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Actinomyces spp.</i> <i>Fusobacterium spp.</i>	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. mutans</i> . <i>A. naeshlundii</i> , <i>A. viscosus</i> <i>F. nucleatum</i>
Placa dental subgengival	<i>Actinomyces spp.</i> <i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Treponemas</i> <i>spp.</i> e outros gêneros anaeróbios.	<i>A. naeshlundii</i> , <i>A. viscosus</i> <i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> , <i>Tannerella</i> <i>forsythensis</i> *, <i>Prevotella spp.</i>
Dorso da língua	<i>Veillonella spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Actinomyces spp.</i> <i>Prevotella spp.</i> ,	<i>V. parvula</i> , <i>V. dispar</i> <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S.</i> <i>parasanguis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> <i>A. odontolyticus</i> . <i>P. melaninogênica</i> .
Mucosa da bochecha, palato, assoalho bucal.	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. constellatus</i>
Saliva	<i>Veillonella spp.</i>	<i>V. parvula</i> .
	Reflete microbiota dos dentes e dorso da língua	

Figura 1 – Distribuição de espécies bacterianas mais frequentemente identificadas nos diferentes nichos ecológicos da cavidade oral. Adaptado de Mager *et al* 2003 (22)

A cavidade oral é um grande ponto de entrada de todo o corpo humano. A comida entra na boca, é mastigada e misturada pela saliva, dirigindo-se para o estômago e trato gastrointestinal e, por sua vez, o ar entra pela boca e pela cavidade nasal na passagem pela traqueia e pulmões. Deste modo, microrganismos que colonizam uma determinada área da cavidade oral têm uma probabilidade significativa de se disseminarem sucessivamente por áreas contíguas à cavidade oral. Evidências sugerem que os microrganismos da cavidade oral podem estar associados ao desenvolvimento de várias patologias sistêmicas, de entre as quais a diabetes melitos (21).

A Diabetes melitos pode provocar alterações do ambiente oral, o que pode resultar numa comunidade de bactérias periodontais diferente daquela presente em indivíduos não diabéticos (23). Existem estudos que apontam para a existência de uma flora alterada nos pacientes com diabetes, sendo que o papel exato destes microrganismos ainda não foi determinado (11). Os resultados de outros evidenciam exatamente o contrário, como é o caso de um estudo desenvolvido por Field *et al* (2012) cujos resultados indicam que não existem diferenças significativas no microbiota subgengival de pacientes com DMT2 comparativamente a controlos saudáveis, sem DMT2 (24).

Os níveis aumentados de glicose no sangue, na saliva e no fluido crevicular gengival podem potencializar o aumento do número de bactérias sacarolíticas, associadas às cáries radiculares. A elevada concentração de ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias como resultado do metabolismo da glicose podem causar desmineralização da superfície do dente e cáries dentárias (25).

1.2.7 Diabetes Melitos e a tendência aumentada a infecções bucais

Os pacientes diabéticos são mais suscetíveis a desenvolver infecções e abscessos, o que pode prejudicar o controle glicêmico. A suscetibilidade a infecções orais, como a candidíase, é favorecida pela hiperglicemia, diminuição do fluxo salivar e alterações na composição da saliva, principalmente o conteúdo de proteínas antimicrobianas (26).

Os fungos são microrganismos naturalmente presentes na cavidade oral de indivíduos saudáveis, mas a sua incidência e virulência parecem estar aumentadas em indivíduos imunocomprometidos. As espécies de *Candida*: *Candida albicans*, *Candida kusei*, *Candida glabrata*, *Candida spp*, sendo que a *Candida albicans* a mais prevalente, podem ser encontradas primariamente nas superfícies das mucosas, placa dentária, infecções endodônticas, lesões peri-implantares, biofilme subgengival das bolsas periodontais, especialmente em pacientes HIV-positivos e em pacientes diabéticos (27-30).

Nos diabéticos, os elevados níveis de glicose presentes na saliva, a diminuição da secreção salivar, a diminuição da função dos neutrófilos e a resposta exacerbada das citocinas dos monócitos/macrófagos podem potencializar o crescimento destes fungos e a sua adesão às células epiteliais orais (29, 31, 32).

A candidíase oral e orofaríngea é uma das infecções oportunistas mais frequentes em pacientes diabéticos não controlados pela diminuição da imunidade celular e humoral, angiopatia e neuropatia (31). Diabéticos com hábitos tabágicos possuem um risco ainda mais elevado de colonização por parte destes fungos (9), bem como os indivíduos diabéticos edêntulos portadores de prótese acrílica (33).

Existe, ainda, uma tendência aumentada para o diabético desenvolver outros tipos de infecções orais, uma vez o funcionamento do sistema imunológico se encontra debilitado. A quimiotaxia e a fagocitose estão diminuídas o que promove uma diminuição da adesão bacteriana às células polimorfonucleares. A microcirculação também pode ser afetada pela diminuição do suprimento sanguíneo (oxigênio) o que pode contribuir para o aumento da suscetibilidade dos diabéticos a infecções, não só na cavidade oral, mas em todo corpo (9).

1.2.8 Diabetes Melitos e o atraso no processo de cicatrização

O processo de cicatrização envolve hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação. A primeira fase de hemostasia inicia-se imediatamente após a realização da ferida, com construção vascular e formação do coágulo de fibrina. A fase inflamatória é caracterizada pela infiltração sequencial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. A fase de proliferação sobrepõe-se à fase inflamatória e é caracterizada por proliferação e migração epitelial pela matriz provisória da ferida, vascularização, síntese de colagénio e formação de matriz extracelular. A remodelação do colagénio, maturação vascular e regressão ocorrem na fase de remodelação. Existem múltiplos fatores locais e sistêmicos que podem debilitar o processo de cicatrização, sendo a Diabetes melitos um exemplo de um fator sistémico (34).

O paciente diabético possui uma diminuição da circulação vascular, pela presença de desordens vasculares, causando hipoxia o que potencia as reações inflamatórias iniciais e aumenta os radicais livres oxidantes, atrasando a cicatrização. Estes radicais livres oxidantes são exponenciados pela presença de elevadas concentrações de glicose e promovem a formação de AGEs, inibindo a vascularização. Os radicais oxidantes são ainda responsáveis pela formação incompleta e alterada das *gap junctions* dos vasos sanguíneos. Os elevados níveis de açúcares são diretamente responsáveis pela formação incompleta das *gap junctions*, mesmo na ausência de *stress* oxidativo e também promovem a produção de TNF- α , fator envolvido na inibição da hemangiogénese (34). O excesso de AGEs quebra as ligações das fibras de

colagénio o que impede a formação do coágulo de fibrina, desenvolvendo-se um estado de hipofibrinólise, característico dos diabéticos.

A alteração da concentração de glicose e insulina no sangue é responsável pela supressão da imunidade inata: diminuição do número de neutrófilos, aumento dos depósitos de AGEs que promovem a diminuição dos infiltrados de neutrófilos e da sua atividade de quimiotaxia, bem como a diminuição da atividade de quimiotaxia dos monócitos. A alteração destes mecanismos é responsável por uma cicatrização debilitada (34).

Os pacientes diabéticos estão sujeitos a um estado de imunossupressão, que está relacionado com um aumento da suscetibilidade a infeções. As infeções locais são diretamente responsáveis pelo atraso na cicatrização e o atraso na cicatrização aumenta a suscetibilidade a infeções. (34).

A Diabetes Melitos tipo 2 é um fator de risco para o desenvolvimento reações adversas após a colocação de implantes dentários. Isto ocorre uma vez que a formação óssea é menor e a osteointegração é reduzida, maioritariamente no osso trabeculado, uma vez que não existe alteração no osso cortical. Por esta razão, o processo de cicatrização é mais fácil de obter na mandíbula do que na maxila, onde está presente mais osso trabeculado (9). Assim, a doença microvascular que leva a uma resposta imunitária e reduzida remodelação óssea possam ser um fator contribuinte na falha dos implantes em pacientes diabéticos (35).

A débil cicatrização das feridas nos pacientes diabéticos é particularmente importante na Medicina Dentária, uma vez que pode ser um fator de risco para tratamentos dentários cirúrgicos invasivos.

1.2.9 O Proteoma da Diabetes Melitos

A análise exaustiva da fisiopatologia celular levou à necessidade de desenvolver novos estudos que permitissem esclarecer os mecanismos fisiopatológicos moleculares da DMT2. Neste âmbito, surgem os estudos experimentais realizados no nível da proteómica de tecidos (36).

O proteoma representa o conjunto de proteínas expressas pelo genoma de uma espécie, um órgão, ou uma célula num momento particular e em condições específicas (1). Os estudos de proteômica permitem analisar o conjunto de proteínas que são efetivamente expressas a partir do genoma do indivíduo, as situações e os níveis em que o são e a presença de modificações pós-tradução. Estes dados permitem elucidar os mecanismos, funções biológicas, caracterizações funcionais e redes de funcionamento celular de um dado sistema biológico nos contextos fisiológicos/patológicos, ou seja esclarecer o fisioma oral, designado por OralOma (37).

O mesmo tipo de célula pode apresentar diferentes proteomas em resposta a diferentes ambientes, variando com a ação de fármacos, infeções por agentes patogénicos, poluição e diferentes tipos de *stress* abiótico (36). Os estudos de proteômica têm como objetivo a comparação de proteomas em diferentes condições, em determinados tecidos em situações normais ou em doença, de forma a identificar expressões proteicas anómalas (8).

No estudo da Diabetes, inicialmente, os ensaios experimentais de proteômica foram dirigidos à análise de diversos tecidos como o músculo, o fígado, o tecido adiposo, e as ilhotas pancreáticas (8). Mais recentemente surgiram os estudos experimentais de proteômica dirigidos aos tecidos orais, recorrendo a técnicas de proteômica salivar, usando como grupos pacientes com DMT2 e pacientes sem DMT2, de forma a poder estudar e comparar as alterações moleculares características da doença (38). Esta identificação dos componentes moleculares capazes caracterizar o Oraloma da DMT2 através da recolha de saliva potencia a sua utilização como fluido de diagnóstico e prognóstico desta patologia. A utilização deste fluido de diagnóstico apresenta inúmeras vantagens comparativamente com a análise do sangue e dos seus componentes, nomeadamente o seu baixo custo, não invasivo, de fácil utilização e recolha menos invasiva para o paciente e mais segura para os profissionais (39).

Na última década foram publicados inúmeros estudos experimentais que forneceram dados de proteômica salivar de pacientes com DMT2. No entanto, estes dados não existem de uma forma integrada, estão espalhados nestas publicações, tornando difícil a sua compilação e interpretação, de forma a

poder estabelecer relações e tirar conclusões à luz das evidências científicas (40).

O desenvolvimento do OralCard veio colmatar esta falha, uma vez que é uma ferramenta bioinformática que reúne informações consideradas essenciais acerca das proteínas orais identificadas em várias bases de dados biomédicas e em estudos experimentais de proteômica salivar. Esta ferramenta, em constante actualização, permite analisar a extensa informação obtida, (agrupa dados referentes à proteína, organiza e relaciona as informações biológicas), facilitando a interpretação desta informação e o esclarecimento de mecanismos moleculares e fisiopatológicos (37, 40). Os dados presentes no OralCard permitem ainda caracterizar as alterações da expressão das proteínas salivares na diabetes melitos. Actualmente, esta ferramenta bioinformática possui informações relativas a 445 proteínas consideradas alteradas (sobre ou sub reguladas) na diabetes melitos tipo 2 (40).

O desenvolvimento das bases de investigação da saliva, surte aos investigadores de Medicina Dentária fundamentos científicos fundamentais para desenvolver novas ferramentas clínicas que permitam pesquisar amostras de saliva, de forma precisa, em busca da presença ou ausência de biomarcadores específicos da DMT2 (41).

1.3 Glicosilação Enzimática de Proteínas

A glicosilação enzimática de proteínas, caracterizada pela adição covalente de um motivo de açúcar a aminoácidos específicos, é considerada a modificação pós-tradução mais comum de todas as modificações pós-tradução, estimando-se que cerca 50% das proteínas expressas nas células possam sofrer glicosilação (42). A glicosilação difere das outras modificações covalentes proteicas, como a fosforilação, acetilação e formilação no tamanho e na complexidade do grupo adicionado e na magnitude de maquinaria celular dedicada à sua síntese e modulação (43).

A glicosilação proteica permite monitorizar o estado do *fold*ing proteico, atuando como um mecanismo de controlo de qualidade das proteínas. Os

motivos de açúcar podem funcionar como ligandos para recetores na superfície celular, mediando a ligação celular ou estimulando as vias de transdução (44). Estes oligossacarídeos podem ser grandes e volumosos e afetar as interações proteína-proteína, ajudando ou inibindo a ligação das proteínas a domínios de interação. Para além disso, pelo facto de serem hidrofílicos podem ainda alterar a solubilidade das proteínas e, conseqüentemente, a sua função (45).

As proteínas glicosiladas (glicoproteínas) podem ser encontradas em praticamente todos os organismos vivos, incluindo eucariotas, *eubacteria* e *archae*, sendo que os eucariotas possuem a maior variedade de organismos a expressar glicoproteínas, desde seres unicelulares até aos organismos multicelulares complexos (46).

A diversidade de glicoproteínas é inigualável por qualquer outra modificação pós-tradução. Esta variabilidade provém do facto de este fenómeno poder ser alterado em vários aspetos, nomeadamente: (47)

- **Ligação glicosídica:** o local de ligação do glicano (oligossacarídeo)
- **Composição do glicano:** os tipos de açúcares que estão ligados a uma proteína em particular
- **Estrutura do glicano:** cadeias ramificadas ou não ramificadas
- **Extensão do glicano:** cadeias de oligossacarídeos curtas ou longas

A glicosilação enzimática além de ser considerada a modificação pós-tradução mais comum é também a mais complexa devido ao elevado número de etapas enzimáticas envolvidas. As enzimas responsáveis pela transferência de mono ou oligossacarídeos de moléculas dadoras para cadeias crescentes de oligossacarídeos ou proteínas e são denominadas glicosiltransferases (47). Estas enzimas possuem elevadas especificidades, daí que cada enzima possa apenas adicionar um tipo de açúcar naquela ligação específica. Apesar de cada glicosiltransferase ser altamente específica, existem várias glicosiltransferases com especificidades similares (43). Contrariamente às glicosiltransferases, as glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica, removendo os grupos açúcar das proteínas, sendo que cada uma destas enzimas também demonstra especificidade para a remoção de um açúcar específico (48).

A glicosilação é controlada pela movimentação das proteínas para áreas com concentrações enzimáticas diferentes; a célula sequestra as enzimas para compartimentos específicos para regular a sua actividade (48).

As proteínas não estão restritas a um tipo particular de glicosilação. Muitas vezes, as proteínas são glicosiladas em múltiplos locais com diferentes tipos de ligações glicosídicas (48). Contrariamente à síntese de DNA/RNA, a glicosilação é um processo que não segue nenhum “modelo” pré-definido. Apesar de todas as células do organismo possuírem os mesmos genes codificadores de glicosiltransferases, estes não são expressos a toda a hora. Dependendo da idade do organismo, do tecido, do estágio celular, diferentes padrões de transferases são expressas, originando diferentes estruturas de glicanos. Assim, algumas cadeias de glicanos características podem ser usadas como marcadores para diagnóstico, potenciais alvos terapêuticos em determinadas doenças como o cancro (43).

1.4 Glicosilação Não Enzimática de Proteínas

A glicosilação não enzimática de proteínas é um processo no qual as proteínas reagem com moléculas redutoras de açúcares para formar AGEs (43). Também conhecida como reacção de *Maillard*, é uma reacção não enzimática entre os grupos amina (predominantemente o grupo ϵ -amino da lisina e o grupo guanidina da arginina) e os grupos carbonyl de açúcares redutores (42).

A possibilidade de ocorrência destas glicosilações não enzimáticas resulta da presença de agentes glicosidantes, nomeadamente a glicose ou os seus metabolitos, como a frutose, relacionando-se directamente com a sua concentração no meio. Um meio com glicose em abundância, hiperglicémico, característico da DM2, permite que exista muita disponibilidade desta molécula ou dos seus metabolitos para ocorra a união química entre o grupo amina das proteínas e as moléculas redutoras de açúcares (42).

A glicosilação não enzimática, nestes pacientes, vai ocorrer tanto no sangue como na saliva, fluídos em as concentrações de glicose se encontram aumentadas (19).

O aumento da glicosilação não enzimática em pacientes com DMT2 pode conduzir a uma formação acelerada de AGEs, que uma vez acumulados podem apresentar efeitos deletérios. Esta acumulação é extremamente importante nas proteínas com uma semi-vida biológica longa, como por exemplo o colagénio, que neste caso está associado à patogénese e complicações da Diabetes Melitos (43).

1.5 A glicosilação e a resposta imune

O papel fisiológico dos hidratos de carbono e dos seus ligandos é extremamente diversificado e inclui o desempenho de funções críticas na comunicação e adesão celular, estabilidade estrutural das proteínas, estrutura membranar e sinalização celular. Os glicanos e os seus agentes de ligação realizam um papel fundamental em praticamente todos os aspetos da imunologia (49).

Todas as células possuem a sua superfície essencialmente revestida por recetores imunes (glicoproteínas), incluindo recetores de reconhecimento de padrões (PRRs), complexos proteicos de histocompatibilidade (MHC de classe I e II), recetores de quimiocinas, recetores de citocinas, co-recetores de células T e B. O papel dos glicanos nestas moléculas é tão variado como as próprias moléculas em si. Outros componentes do sistema imune são as diversas proteínas que se ligam aos glicanos (GBPs) ou lectinas, que incluem lectina tipo-C, *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins* (SIGLECS), e galectinas. Através da ligação a lectinas e da modulação estérica de interações moleculares, os glicanos participam numa diversidade de mecanismos celulares que contribuem para as respostas imunes inata e adaptativa (49).

As glicoproteínas secretadas no sistema imune incluem quase todas as citocinas e quimiocinas, muitos dos componentes do complemento e anticorpos. As glicosilações podem assim modular a atividade dos anticorpos, vias de ativação de complemento e a atividade de citocinas/quimiocinas (49).

No que concerne aos microrganismos, a vasta maioria dos seus imunogénos são glicanos ou glicanos conjugados, e quase todas as bactérias e vírus estão revestidas por uma espessa camada de glicocálice (revestimento

de açúcares). Algumas bactérias estão completamente encapsuladas com polissacarídeos, enquanto outras têm espessos revestimentos de endotoxinas e outras de glicolípidos. As bactérias gram positivas possuem peptidoglicanos expostos externamente. Um ponto importante é o facto de muitos agentes patogénicos terem desenvolvido hidratos de carbono similares aos do hospedeiro e a sua superfície celular mimetizar a do hospedeiro, o que lhes pode permitir escapar da deteção imune (49).

Observações pioneiras evidenciam a existência de uma remodelação programada dos glicanos da superfície celular na transição de tecidos normais para tecidos inflamados. Estas alterações afetam a emigração e o tráfego das células imunes para o local da inflamação. A glicosilação pode controlar a inflamação e a autoimunidade através da modulação de outros *checkpoints* homeostáticos (49).

Durante a infeção, mediadores inflamatórios, como o TNF α , aumentam as concentrações das moléculas de selectina na superfície das células endoteliais, perto do local da infeção. Estas moléculas de adesão ligam-se aos leucócitos na circulação via glicanos na superfície celular para facilitar a recruta de leucócitos para o local da infeção. Este processo é muito importante para a eficácia da resposta imune e está altamente dependente das estruturas dos glicanos que estão presentes na população dos leucócitos. Deste modo, é espectável que alterações nestes glicanos possam alterar a capacidade das células se deslocarem até aos pontos de infeção de modo a desencadarem a resposta imune apropriada (50).

A barreira epitelial constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos e os glicanos desempenham um papel crítico na adesão e comunicação celular. Nas superfícies das mucosas, as mucinas, proteínas extremamente glicosiladas, desempenham um papel fulcral na barreira física entre o hospedeiro e o micróbio. Alterações das estruturas dos glicanos destas proteínas podem comprometer a barreira epitelial, permitindo a penetração destes micróbios (50). Alterações da glicosilação, associadas a doenças, podem estar diretamente associadas com um aumento da susceptibilidade a infeções (50).

Assim, os processos de inflamação e infeção podem alterar e modelar os mecanismos de glicosilação do hospedeiro, desencadeando alterações

estruturais nas suas proteínas e conseqüentemente nas suas funções celulares. Por outro lado, as alterações nos mecanismos de glicosilação das proteínas do hospedeiro podem levar ao desenvolvimento da inflamação, aumento da suscetibilidade de infecção e disfunção imune (50).

2. OBJECTIVOS

A realização do presente trabalho parte da identificação de modificações no Oraloma de pacientes com Diabetes Melitos tipo 2 associadas a alterações de glicosilação proteica e do conhecimento de que os microrganismos presentes na cavidade oral possuem as enzimas necessárias para glicosilar/desglicosilar proteínas. A proposta para esta dissertação surge da ausência de estudos que relacionem as proteínas microbianas predominantes nos tecidos orais de pacientes com DMT2 com as alterações dos mecanismos moleculares que ocorrem na cavidade oral destes pacientes.

Os objetivos, desta dissertação, serão:

- Catalogar todas as proteínas humanas e microbianas da cavidade oral de pacientes com DMT2 e anotar manualmente informações relevantes para a interpretação de dados de proteómica nesta patologia;
- Actualizar o OralCard com a informação levantada no decorrer deste trabalho;
- Avaliar as implicações funcionais das proteínas humanas orais identificadas no proteoma salivar de DMT2;
- Identificar glicosiltransferases e glicosidases produzidas pelos microrganismos mais prevalentes do paciente diabético;
- Avaliar a atividade de glicosidase e glicosiltransferase das proteínas produzidas pelos microrganismos que interagem com as proteínas orais da DMT2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta secção inclui as metodologias realizadas no decurso do presente trabalho de modo a atingir os objetivos propostos.

Oraloma humano da DMT2

Composição

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica com recurso à ferramenta de pesquisa avançada do portal PubMed, usando como palavras-chave os termos Mesh: “Type 2 diabetes mellitus and salivar proteom*”, “Diabetes mellitus type 2 and oral and saliva* (protein* or proteom*)”.

Foram incluídos os artigos com resultados experimentais referentes à espécie *Homo sapiens* e com data de publicação compreendida entre 01/01/1997 e 18/12/2012. A seleção de artigos a analisar incluiu os resultados experimentais de estudos de proteómica de tecidos orais. Foram excluídos artigos que não fossem referentes à DMT2 ou estudos experimentais com amostras não provenientes da cavidade oral de pacientes pertencentes à espécie *Homo sapiens*.

Com base nestes artigos foi atualizada a base de dados do proteoma salivar do OralCard referente ao OralOma da Diabetes Melitos tipo 2. Foi realizado um levantamento de todas as proteínas salivares alteradas no paciente com DTM2, que ainda não estavam incluídas na base de dados do proteoma oral do OralCard.

Anotação manual de informação relativa às proteínas da DMT2

A análise de cada um dos estudos experimentais permitiu anotar manualmente uma série de informações consideradas essenciais para a interpretação dos dados catalogados. Esta inclui dados de identificação de cada uma das proteínas, o local de obtenção da amostra, a relação de cada proteína com os estados de saúde e de doença, a caracterização do dador da amostra, a caracterização dos métodos de amostragem e de análise, bem

como a presença de modificações pós-tradução associadas a cada proteína (Figura 2). Esta informação pode ser igualmente útil em casos onde seja necessário realizar uma análise comparativa de discrepâncias de resultados de estudos.

UniProtKB AC	Name	Organism	Parotid	Parotid Exosome	SM/SL	Minor	Whole Saliva	Crevicular Fluid	Mucosa
Tongue	Health	Disease (OMIM ID or Diseases Database)	Disease (MeSH ID)	Regulation	Age group	Gender*	Social Habits*	Methods of Sampling*	Methods of Analysis**
Type of Study	PTM	Biomarkeration (NCBI)	Obs.						

Figura 2 – Cabeçalhos que permitem a organização da informação recolhida dos diferentes estudos de proteómica da cavidade oral (proteínas salivares da DMT2 anotadas manualmente) numa tabela em Microsoft Excel 2010

Origem das proteínas orais da DMT2

As possíveis origens das proteínas orais da DMT2 anotadas são as glândulas parótidas, o exossoma da glândula parótida, glândulas submandibulares e sublinguais, glândulas minor, fluído crevicular, mucosa oral, saliva total e língua (Figura 3).

Parotid	Parotid Exosome	SM/SL	Minor	Whole Saliva	Crevicular Fluid	Mucosa	Tongue
---------	-----------------	-------	-------	--------------	------------------	--------	--------

Figura 3 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 relativa à origem das proteínas da DMT2 anotadas manualmente

A análise dos dados relativos à origem das proteínas salivares, descritas na tabela acima, foi realizada com recurso a uma ferramenta especializada no cálculo e desenho de Diagramas de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Esta permite calcular as intersecções de diversas listas de elementos (máximo de 30 listas). Com a sua utilização obtém-se um resultado textual que permite identificar que elementos estão em cada uma das intersecções ou são únicos numa determinada lista.

Fornece a possibilidade de criação de um diagrama de venn simétrico (padrão) ou assimétrico.

Figura 4 – Visualização da ferramenta Diagrama de Venn após a inserção dos dados das quatro listas a intersectar

O resultado obtido consistiu num diagrama representativo da intersecção das quatro listas introduzidas (Figura 4).

Relação com os estados de saúde e de doença

A anotação da relação das proteínas da DMT2 com os estados de saúde ou doença permite inferir se as proteínas em análise estão presentes exclusivamente em indivíduos saudáveis, se apenas são produzidas ou estão presentes na saliva de indivíduos com uma determinada patologia ou se estão presentes em ambos os casos. Para identificar a patologia foi anotado o seu OMIM ID (*Online Mendelian Inheritance in Man*) e o seu código MESH (Figura 5).

Health	Disease (OMIM ID or Diseases Database)	Disease (MeSH ID)	Regulation
--------	--	-------------------	------------

Figura 5 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente à relação das proteínas anotadas da DMT2 com os estados de saúde e doença

A regulação de uma determinada proteína corresponde à variação da sua expressão na doença em relação ao controlo saudável. A regulação das proteínas salivares da DMT2 teve em consideração a *fold change calculation*:

$$\frac{\text{Número de ocorrências na doença}}{\text{Controlo de ocorrências no controlo}} = \text{Valor}$$

Hipótese a) valor ≥ 1 : regulação positiva (+)

Hipótese b) $0 < \text{valor} < 1$: regulação negativa (-)

Em **b)**, é necessário realizar o quociente abaixo descrito para que se obtenha uma regulação com valor negativo:

$$\frac{1}{\text{Valor}} = Y \text{ (a este é atribuído o valor negativo = - Y)}$$

Este quociente permite uma melhor interpretação dos dados, uma vez que uma *fold change calculation* com um valor de, por exemplo, 0,5 corresponde a uma diminuição na quantidade de expressão da proteína de 2 vezes. Realizando o quociente descrito em **b)** obtemos diretamente o valor de -2, o que torna a interpretação dos dados mais directa.

Caracterização do dador da amostra

A caracterização do dador da amostra inclui a sua faixa etária, género e hábitos sociais (por exemplo o tabagismo), uma vez que estes fatores podem ser modificadores da expressão proteica dos indivíduos. Os critérios de exclusão definidos pelos autores de cada estudo analisado foram igualmente anotados (Figura 6).

Age group	Gender*	Social Habits*
-----------	---------	----------------

Figura 6 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente à caracterização do dador da amostra de saliva

Métodos de amostragem e análise

Os métodos de amostragem e análise permitem caracterizar a metodologia utilizada na colheita, na identificação e na análise das proteínas salivares. Esta informação é essencial para interpretar dados de proteômica uma vez que se sabe que diferentes técnicas de amostragem (por exemplo a recolha de saliva de forma estimulada *versus* não estimulada) ou diferentes metodologias de análise, como por exemplo técnicas de proteômica *top-down* ou *bothom-up* permitem identificar diferentes proteínas (Figura 7).

Methods of Sampling*	Methods of Analysis**
----------------------------	-----------------------------

Figura 7 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente aos métodos de amostragem e análise das proteínas salivares da DMT2

Outras informações

Foram ainda anotadas informações acerca do tipo de estudo, presença de modificações pós-tradução nas proteínas identificadas e viabilidade definida pelo autor do estudo da utilização de determinada proteína como biomarcador molecular da patologia. No caso específico da DMT2 a anotação das da glicosilação das proteínas orais é de extrema importância no estudo e compreensão dos mecanismos moleculares desta patologia nos tecidos orais dos indivíduos que a detêm.

Caracterização funcional

Com o objetivo de compreender o papel fisiológico das proteínas orais da DMT2 estas foram classificadas funcionalmente de acordo com a sua ontologia, nomeadamente o processo biológico em que intervêm, a função molecular que desempenham e vias de sinalização em que participam. Esta classificação foi realizada com recurso à ferramenta PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) (<http://pantherdb.org>) (51). O

PANTHER permite a obtenção de informação acerca de um gene de interesse; explorar famílias de proteínas, funções moleculares, processos biológicos, componentes celulares e vias de sinalização; gerar listas de genes que pertencem a determinadas famílias ou subfamílias de proteínas, que têm uma determinada função molecular ou participam num processo biológico ou via de sinalização; e analisar listas de genes, proteínas ou transcritos de acordo com categorias baseadas na família, função molecular, processo biológico, componente celular e via de sinalização.

The screenshot displays the PANTHER Classification System interface. At the top, there is a navigation bar with links for Home, About, PANTHER Data, PANTHER Tools, Workspace, Downloads, and Help/Tutorial. Below this, a banner indicates 'PANTHER 8.1 released' with a link to view details. The main content area is titled 'Gene List Analysis' and contains three steps for configuration:

- 1. Enter IDs and or select file for batch upload. Else select file or list from workspace for comparing to a reference list.**
 - Enter IDs: A text input field containing 'P03284', 'P06231', and 'Q00000'. A note says 'separate IDs by a space or comma'.
 - Upload IDs: A file selection button labeled '(Escolher ficheiro)' with the text 'Nenhum ficheiro selecionado'.
 - Select List Type: Radio buttons for 'ID List' (selected), 'Previously exported text search results', 'Workspace list', and 'PANTHER Generic Mapping File'. A note says 'Please login to be able to select lists from your workspace.'
- 2. Select organism.**
 - A dropdown menu showing 'Homo sapiens' selected, with other options: 'Mus musculus', 'Rattus norvegicus', 'Gallus gallus', and 'Danio rerio'.
- 3. Select Analysis.**
 - Radio buttons for 'Functional classification viewed in gene list' (selected), 'Functional classification viewed in pie chart', 'Statistical overrepresentation test', and 'Statistical enrichment test'.

A 'submit' button is located at the bottom right of the configuration area. On the left side of the interface, there are sections for 'Search', 'Quick links', and 'Newsletter subscription'.

Figura 8 - Sistema de análise em grupo da ferramenta de classificação do PANTHER. As opções selecionadas correspondem às definições utilizadas para analisar os conjuntos de proteínas anotados na DMT2

Inicialmente, inserem-se os códigos do UniprotKB de identificação de proteínas anotadas da DMT2, seleciona-se a espécie humana e o tipo de análise desejado, obtendo-se como resultado uma lista com uma série de informações acerca das proteínas inseridas (Figura 8).

Posteriormente, escolhe-se o tipo de classificação desejado: segundo as funções moleculares, os processos biológicos, os componentes celulares, as classes proteicas e/ou as vias de sinalização (Figura 9).

Home About PANTHER Data PANTHER Tools Workspace Downloads Help/Tutorial

PANTHER 8.1 released [Click to view details](#)

PANTHER GENE LIST [?](#) [Customize Gene list](#)

Convert List to: Send list to:

Display: items per page [Refine Search](#)

Hits 1-30 of 53 [page: (1) 2] Number of mapped ids found 53 [IDs not found](#)

Gene ID	Gene name Gene Symbol	Mapped IDs	Ortholog	PANTHER Family/Subfamily	GO Molecular
<input type="button" value="clr"/> <input type="button" value="all"/>				<input checked="" type="checkbox"/>	

[MF Pie Chart](#)
[BP Pie Chart](#)
[CC Pie Chart](#)
[PC Pie Chart](#)
[Pathway Pie Chart](#)

Figura 9 – Seleção do tipo de classificação por ontologia desejado, na ferramenta PANTHER.

Nesta abordagem foram apenas utilizadas as classificações segundo as funções moleculares, os processos biológicos e as vias de sinalização.

Comparação com o OralOma Normal

O objetivo desta análise foi determinar estatisticamente se as diferentes ontologias das proteínas salivares da DMT2, resultantes da classificação obtida com recurso à ferramenta PANTHER, se encontravam acima ou abaixo dos valores esperados comparativamente a indivíduos normais, sem patologias associadas (OralOma normal). Para tal, cada lista de proteínas salivares da DMT2 classificada segundo uma determinada ontologia PANTHER (função molecular, processo biológico ou via de sinalização) foi comparada com uma lista de referência (OralOma normal) e foi aplicado um teste binomial descrito por Cho & Campbell, TIGs, em 2000, (52) para obter a significância estatística expressa segundo um nível descritivo (*p-value*). O *p-value* representa a probabilidade de erro envolvida em aceitar o resultado observado como válido, isto é como representativo da “população”. Dizer que um resultado é estatisticamente significativo significa que as diferenças encontradas são grandes o suficiente para não serem atribuídas ao acaso, com uma certeza estabelecida.

A lista de referência (OralOma normal) derivou da base de dados do OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>) (37, 40). Esta ferramenta bioinformática, em constante atualização, reúne os dados de proteómica salivar, provenientes de amostras de saliva, identificados a partir estudos

experimentais, permitindo a caracterização das proteínas segundo o local de produção da proteína, a sua função molecular, a presença de modificações pós-tradução, a sua associação a doenças, entre outros.

O supra-sistema oral na DMT2

Microbioma Oral da DMT2

No sentido de identificar o microbioma oral da DMT2, foi realizada uma pesquisa bibliográfica com recurso à ferramenta de pesquisa avançada do portal PubMed, usando como palavras-chave os termos Mesh: “Type 2 diabetes mellitus and oral bacteria”, “Type 2 diabetes mellitus and oral and microbiota”, “Type 2 diabetes mellitus and oral and microflora”.

Foram incluídos os artigos com resultados experimentais referentes à espécie *Homo sapiens* e com data de publicação compreendida entre 01/01/1997 e 18/12/2012. A seleção de artigos a analisar incluiu os resultados experimentais de estudos de proteómica de tecidos orais. Foram excluídos artigos que não fossem referentes à DMT2 ou estudos experimentais com amostras não provenientes da cavidade oral de pacientes pertencentes à espécie *Homo sapiens*.

Esta pesquisa permitiu realizar o levantamento dos todos os microrganismos alterados na microflora oral do paciente com DMT2 e anotar uma série de informações consideradas essenciais para a interpretação dos dados catalogados. Esta inclui dados de identificação de cada um dos microrganismos, o local de obtenção da amostra, a sua relação com os estados de saúde e de doença, a regulação, a caracterização do dador da amostra, a caracterização dos métodos de amostragem e de análise, tal como foi realizado para caracterizar o proteoma salivar da DMT2.

Após a identificação dos microrganismos alterados nos tecidos orais dos pacientes com DMT2, recorreu-se à utilização da ferramenta de pesquisa de *Taxonomy* da base de dados do NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>) para obter informações acerca da classificação e nomenclatura de todos os microrganismos identificados.

Com o objetivo de identificar as proteínas bacterianas produzidas pelos microrganismos do microbioma oral da DMT2, recorreu-se à base de dados do UniprotKB (<http://www.uniprot.org/>) (53). Esta base de dados possui informação estrutural e funcional sobre cada proteína, bem como os seus diferentes nomes, estados de revisão, organismos onde foram identificadas, domínios, interações, estruturas tridimensionais, entre outros (Figura 10).

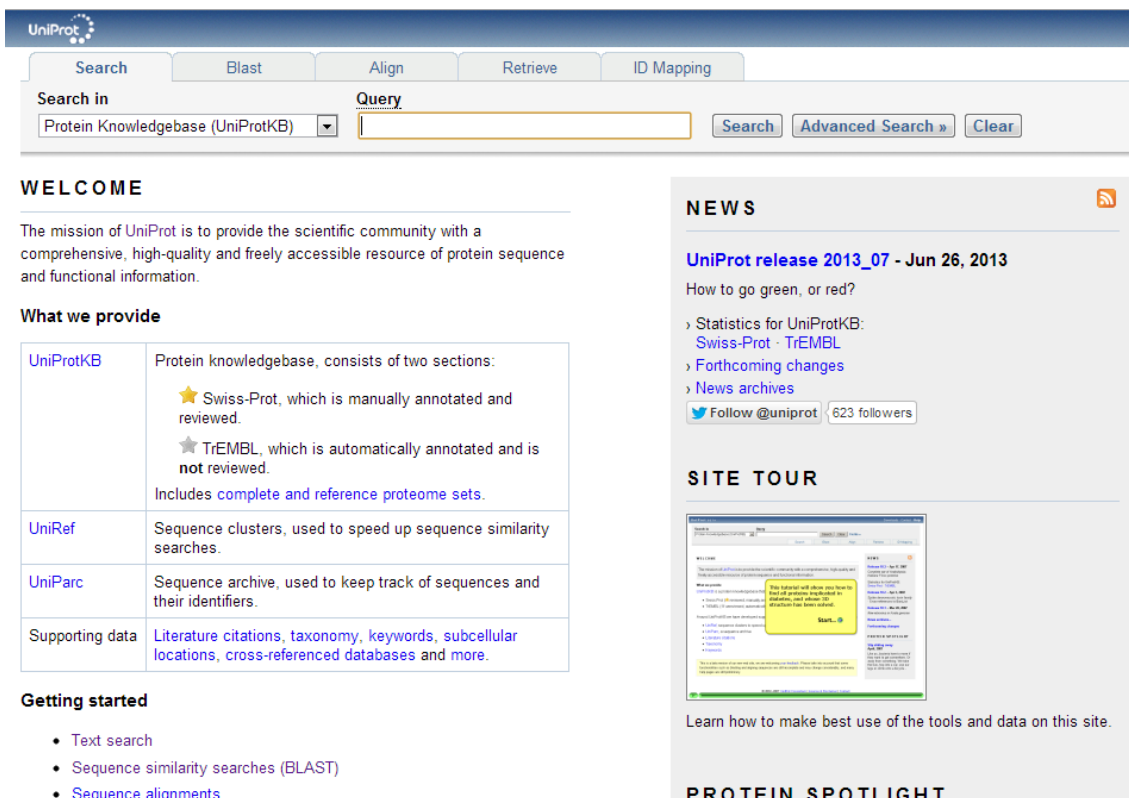


Figura 10 - Página de rosto da base de dados do UniprotKB

Nesta base de dados, recorreu-se à ferramenta *search*, inserindo-se o nome de cada um dos microrganismos identificados como alterados, de forma individual, para se identificar as proteínas por ele produzidas (Figura 11).

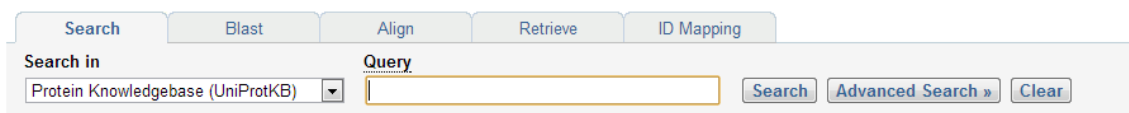


Figura 11 - Ferramenta *search* da base de dados do UniprotKB

A ferramenta *retrieve* permitiu obter informação personalizada e adaptada às necessidades do utilizador para todas as proteínas anteriormente obtidas (Figura 12).

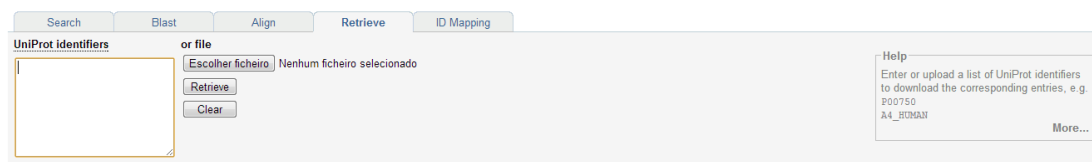


Figura 12 - Ferramenta *retrieve* da base de dados do UniprotKB

Após a identificação de todas as proteínas produzidas pelos microrganismos pertencentes ao microbioma oral da DMT2 foi necessário agrupar todas aquelas que possuem capacidade de glicosilar/desglicosilar outras proteínas. Para tal, recorreu-se à base de dados Brenda (<http://www.brenda-enzymes.info/>) (54) que reúne toda a informação estrutural/funcional de enzimas. Esta permitiu identificar as classes de enzimas catalisadoras de reações de modificação proteica pela adição ou remoção de açúcares, sendo agrupadas de acordo com o seu *EC Number*. O *EC Number* é dado pela IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) e as classes das enzimas são definidas de acordo com o tipo de reação que catalisam. Um *EC Number* é composto por quatro números divididos por um ponto. Uma vez identificados os *EC Number* das enzimas com capacidade de adicionar ou remover açúcares, foi realizado um filtro na tabela Microsoft Excel 2010 gerada anteriormente.

Interactoma microbiota-proteoma humano oral na DMT2

Uma vez identificado o proteoma oral da DMT2 foram inferidas as suas redes de interações com as proteínas bacterianas presentes nos tecidos orais humanos, recorrendo ao Oralint (<http://bioinformatics.ua.pt/software/oralint/>). Este é o primeiro modelo computacional que permite prever as interações proteína-proteína (PPIs) inter-espécies na cavidade oral humana, ou seja, permite prever o interactoma humano-bacteriano. Este modelo inclui 4707 proteínas identificadas nos estudos de proteómica como presentes nos tecidos orais da espécie *Homo sapiens*, disponíveis na base de dados do OralCard e uma compilação de dados provenientes de cinco bases de dados que continham informação de interações proteicas determinadas experimentalmente com elevada qualidade. Os dados de proteómica são inseridos no modelo e o resultado final é filtrado segundo os níveis de

confiança das PPIs. A previsibilidade do modelo provém do facto de os domínios de ligação das proteínas possuírem elevada afinidade estrutural e físico-química, com uma certa conservação e da presença de evidências de que os seus homólogos proteicos interagem frequentemente do mesmo modo.

O GlicoOralOma da DMT2

O OralCard possui informação acerca da presença de modificações pós-tradução nas proteínas salivares e de qual a modificação a que a proteína pode estar sujeita. Estes dados permitiram a recolha de todas as proteínas salivares com possibilidade de sofrer modificações pós-tradução de glicosilação dos tecidos orais dos indivíduos saudáveis. Posteriormente foi realizada a intersecção destes dados provenientes do OralCard com o proteoma oral da DMT2 previamente anotado, obtendo-se, assim, o conjunto de proteínas salivares da DMT2 com possibilidade de sofrer glicosilações.

4. RESSULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OralOma humano da DMT2

A definição do OralOma humano da DMT2 é essencial para compreender os mecanismos moleculares desta patologia e a forma como ela se reflete na cavidade oral.

4.1.1 Composição

A identificação das proteínas presentes na cavidade oral de pacientes com Diabetes Melitos Tipo 2 foi conseguida recorrendo a uma extensa pesquisa e análise de resultados de estudos experimentais de proteómica oral. A análise dos resultados destes estudos permitiu identificar os perfis de expressão proteica característicos dos tecidos orais destes pacientes e atualizar a base de dados do OralCard em 39 proteínas. A atualização da informação existente nesta base de dados é indispensável pela constante publicação de estudos experimentais de proteómica salivar com resultados que podem possuir dados que identifiquem proteínas com perfis de expressão alterados, ainda não identificados, ou corroborar resultados experimentais conseguidos por outros autores com desenhos de estudos experimentais semelhantes. Toda esta informação que caracteriza a DMT2 está reunida na base de dados do OralCard e permite aos seus utilizadores a sua coleção de uma forma simplificada e sistemática.

A tabela 1 indica as proteínas orais da DMT2, identificadas nos resultados dos estudos experimentais analisados no decorrer deste trabalho.

Tabela 1- Proteínas salivares identificadas nos tecidos orais da DMT2

UniProtKB AC	Nome	Ratio Fold Change (Control vs. Diabetic)	Referência
A1XBS5	Protein FAM92A1	-91,53	Border MB et al (2012) (55)
O95969	Secretoglobin family 1D member 2 ou Lipophilin-B	17,47	
P01023	Alpha-2-macroglobulin	1,711	

P01036	Cystatin-S	-2,44
P01037	Cystatin-SN	-4,27
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	-6,63
P01834	Ig kappa chain C region	-1,58
P01842	Ig lambda-1 chain C regions	-1,52
P01857	Ig gamma-1 chain C region	1,52
P01876	Ig alpha-1 chain C region	-5,40
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	-5,77
P0DJ18	Serum amyloid A-1 protein	-5,00
P0DJ19	Serum amyloid A-2 protein	-5,00
P02768	Serum albumin	4,08
P02774	Vitamin D-binding protein	2,61
P02787	Serotransferrin	-1,64
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	7,16
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-3,59
P04745	Alpha-amylase 1	4,02
P04908	Histone H2A type 1-B/E	15,09
P05976	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	-2,41
P06733	Alpha-enolase	-3,12
P08118	Beta-microseminoprotein	16,91
P09960	Leukotriene A-4 hydrolase	3,52
P11684	Uteroglobin	1000
P11684	Uteroglobin	204.62
P12273	Prolactin-inducible protein	-1,72
P19961	Alpha-amylase 2B	2,27
P19961	Alpha-amylase 2B	1,78
P23280	Carbonic anhydrase 6	1,99
P23280	Carbonic anhydrase 6	2,92
P23280	Carbonic anhydrase 6	2,09
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	-1,56
P28325	Cystatin-D	-3,08
P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	-3,38
P31025	Lipocalin-1	-1,59
P48723	Heat shock 70 kDa protein 13	3,23
P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	-10,71
P54108	Cysteine-rich secretory protein 3	-2,51
P55042	GTP-binding protein RAD	-63,41
Q06830	Peroxiredoxin-1	10,16
Q07654	Trefoil factor 3	-1,92
Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B	-2,17
Q5F1R6	DnaJ homolog subfamily C member 21	-9,81
Q6P5S2	UPF0762 protein C6orf58	-2,75
Q6P5S2	UPF0762 protein C6orf58	2,60

Q8NGY0	Olfactory receptor 10X1	-9,18	
Q8TAX7	Mucin-7	-4,43	
Q8TDL5	BPI fold-containing family B member 1	2,69	
Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B	-2,64	
Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B	-1,95	
Q99102	Mucin-4	13,17	
Q9HC84	Mucin-5B	-2,16	
Q9HC84	Mucin-5B	-1,82	
Q9NP55	BPI fold-containing family A member 1	47,20	
Q9NP55	BPI fold-containing family A member 1	47,10	
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	-1,82	
Q9UIV8	Serpin B13	6,54	
Q9Y5J9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B	1,90	
Q6CRY5	Elongation factor G, mitochondrial	702,46	
Q92210	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	4,32	
Q9HD89	resistin	2,27	Yin J et al (2012) (56)
P10809	Hsp60 (heat shock protein 60 - mitochondrial)	4,25	Yuan J et al (2011) (57)
P02808	statherin	-4,84	Isola M et al (2012) (7)
P02808	statherin	-3,39	Isola M et al (2011) (58)
P02808	statherin	-3,64	Isola M et al (2011) (59)
P01133	Epidermal growth factor (EGF)	1,21	Oxford GE et al (2000) (60)
P10645	Chromogranin A	9,50	Soell M et al (2010) (61)
P01876	Secretory IgA (sIgA)	1,30	
P61626	Lysozyme	1,26	
P02788	Lactoferrin	1,70	
P02768	Albumin	1,25	
P22079	Salivary peroxidase SPO	1,42	Dodds MW et al (2000) (62)
P05164	Salivary myeloperoxidase MPO	2,28	
P01876	Secretory IgA (sIgA)	1,25	
P61626	Lysozyme	1,15	
P02788	Lactoferrin	1,59	
P02768	Albumin	1,42	
Q9UBU3	Ghrelin (Q9UBU3 - 1) active (DMT2 e obesos)	-2,10	
Q9UBU3	Ghrelin (Q9UBU3 - 2) des-acylated (DMT2 e obesos)	-1,32	
P04745	Alpha-amylase (DMT2 e obesos)	1,25	Aydin S (2007) (63)
Q9UBU3	Ghrelin (Q9UBU3 - 1) active (DMT2 e não obesos)	-1,63	
Q9UBU3	Ghrelin (Q9UBU3 - 2) des-acylated (DMT2 e não obesos)	-1,23	

P04745	Alpha-amylase (DMT2 e não obesos)	1,24	
P22894	MMP-8	1,71	Collin HL et al (2000) (64)
P02768	Albumin	1,19	
P04745	Amylase	1,14	
P22894	Matrix metalloproteinase (MMP-8)	4,00	Costa PP et al (2010) (65)
P05231	IL-6	17,47	
O00300	OPG (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B)	2,00	

Para além das proteínas identificadas neste trabalho, foram ainda utilizadas 445 proteínas já anotadas no OralCard relativas à DMT2, totalizando 484 proteínas que foram utilizadas nas análises subsequentes (Anexos – tabela A).

4.1.2 Relação com os estados de saúde/doença

O conjunto das 484 proteínas identificadas nos tecidos orais do paciente com DMT2 foi também identificado nos controlos saudáveis, ou seja, não foram identificadas proteínas orais exclusivas dos estados de saúde ou doença.

A presença de repetições de códigos de proteínas orais associados a várias *Ratio Fold Change (Control vs. Diabetic)*, na tabela 1, identificadas no estudo experimental desenvolvido por Border *et al* (2012) (55) pode ser explicada pela presença de várias sequências peptídicas capazes de identificar a mesma proteína oral.

Pela análise da tabela 1 é ainda possível inferir a identificação repetida de inúmeras proteínas salivares em diversos estudos, nomeadamente a *serum albumin*, a *amylase*, a *statherin* e a *MMP-8*. Para estas proteínas salivares humanas, os valores de *fold change calculation* indicam um aumento ou diminuição consistente nos resultados dos estudos experimentais que as identificaram. Uma análise mais detalhada de cada uma destas proteínas será necessária para avaliar a sua influência fisiopatologia molecular da DMT2.

A *amylase* é a enzima mais abundante na cavidade oral e é responsável pela hidrólise do amido (66). Esta proteína foi identificada como sendo um constituinte abundante da película de esmalte adquirida e dos compostos salivares primários que aderem selectivamente à superfície do dente (66-68). A *amylase* pode actuar como um receptor para a adesão bacteriana à superfície

dos dentes, uma vez que esta pode ligar-se a várias espécies de *Streptococci*, por exemplo o *Streptococcus gordonii* ou o *Streptococcus sanguinis*. Os resultados de um estudo experimental desenvolvido por Baik et al (2012) indicam que a *alpha-amylase* é uma proteína com elevada afinidade de ligação ao LPS do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, interferindo com a adesão bacteriana e na formação do biofilme. Os resultados deste estudo são coincidentes com os resultados de estudos prévios que indicam que a *alpha-amylase* podia inibir a formação do biofilme de outros patógenos como o *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas aeruginosa* (67). A *alpha-amylase* parece ser uma molécula essencial na imunidade inata da cavidade oral (67). Os resultados do estudo desenvolvido por Choi et al (2011) indicam que a *alfa-amylase* e a *serum albumin* são proteínas com capacidade de ligação ao LPS do *Porphyromonas gingivalis* (68). Estes dados sugerem que a ligação da *alfa-amylase* é vantajosa para as bactérias, uma vez que as ajudam na colonização da cavidade oral (66-68). Estudos prévios demonstram que a *alpha-amylase* contribui para a adesão à hidroxiapatite de bactérias que se ligam à *alpha-amylase* (68).

A *serum albumin* é um constituinte fundamental do plasma, mas também é um constituinte da saliva humana, constituindo cerca de 6% do seu total proteico (68). Esta parece estar envolvida em mecanismos que facilitam o estímulo da resposta imune (67, 68). É conhecido que a albumina se liga ao LPS de bactérias Gram negativas e ao LOS (lipooligosacarídeo) da *Neisseria meningitidis* (67). Os resultados de um estudo desenvolvido por Choi et al (2011) indicam que a *serum albumin* é uma proteína com afinidade de ligação ao LPS do *Porphyromonas gingivalis* e ao LPS do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (68).

A MMP-8 é uma enzima presente no tecido conjuntivo, com capacidade de degradar a matriz extracelular e o colagénio. Esta enzima deriva dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) e é libertada durante a fase aguda das doenças inflamatórias, como por exemplo a periodontite. A MMP-8 degrada colagénio tipo I, o principal constituinte colagenoso do osso e membrana periodontal. Resultados de estudos prévios indicam que níveis elevados de MMP-8 no fluido crevicular gengival estão associados com o aumento da severidade da doença periodontal (69). Nos diabéticos, o fenótipo

hiperglicémico promove o aumento da expressão de AGEs, induzindo o aumento da expressão de MMPs nos tecidos periodontais diabéticos (64). O facto de esta proteína estar aumentada em pacientes com DMT2 é coerente com a relação íntima que esta patologia possui com a periodontite.

A *statherin* é uma pequena proteína salivar com uma grande afinidade para a hidroxiapatite. Esta liga-se ao esmalte dentário e forma, em conjunto com as proteínas ricas em prolina, uma película que recobre o esmalte da coroa dos dentes. Adsorvida no esmalte, desempenha múltiplas atividades relacionadas com a manutenção da saúde dentária. A capacidade da *statherin* inibir a precipitação espontânea do fosfato de cálcio, ajuda na promoção da supersaturação salivar que permite uma relação ótima da desmineralização/remineralização do dente, podendo por isso ser considerada um indicador do risco de desenvolvimento de cáries. A ligação ao esmalte causa alterações na conformação espacial da *statherin*, permitindo a ligação de microrganismos e a consequente formação da placa bacteriana aderida à superfície dentária. Uma elevada atividade da *statherin* foi demonstrada nos grânulos serosos das glândulas parótida e submandibular, confirmando o facto de que estas glândulas serem uma importante fonte de *statherin* na saliva humana. Existem evidências de que a incidência de cáries, perdas dentárias, doença periodontal e candidíase afeta fortemente os diabéticos, daí que a diminuição da produção desta proteína possa estar associada com o aumento da incidência de complicações orais em diabéticos. Os resultados do estudo desenvolvido por Isola *et al* (2011) indicam que existe uma diminuição da secreção de *statherin* por parte das glândulas submandibulares, glândulas parótidas e glândulas minor. A redução da produção de *statherin* parece ser consequência do aumento do *stress* oxidativo nos tecidos dos diabéticos (7, 58, 59).

4.1.3 Caracterização do dador da amostra

A caracterização do dador da amostra inclui a análise da sua faixa etária, do seu género e hábitos sociais relevantes. O intervalo de variação geral da faixa etária das populações incluídas em todos os estudos analisados está

compreendido entre os 18 e os 75 anos. Esta grande amplitude prevê uma grande variabilidade nos resultados de regulação das proteínas observadas, uma vez que a idade é um fator modificador da expressão proteica nos indivíduos. O avançar da idade tem associadas alterações na cavidade oral que podem promover o aumento da expressão de determinadas proteínas orais e a diminuição da quantidade de saliva produzida. De notar a variabilidade em termos de raça e de género, uma vez que foram incluídos, nas populações dos estudos experimentais, indivíduos de raça caucasiana e afro-americana, e indivíduos do sexo feminino e masculino. A presença de hábitos sociais como o tabagismo pode exponenciar a inflamação e o *stress* oxidativo, presente nos diabéticos e amplificar o dano da função das células β e a alteração das células endoteliais (70). Esta heterogeneidade dificulta a análise dos dados de proteómica no seu todo e tem de ser tida em conta a quando da sua interpretação fisiológica.

De referir que a caracterização do dador da amostra nos estudos analisados não inclui a análise dos factores de risco para o desenvolvimento da diabetes (modificáveis e não modificáveis). A futura anotação desta informação poderá revelar-se útil potenciando uma melhor interpretação dos resultados dos estudos de proteómica em pacientes com DMT2.

4.1.4 Métodos de amostragem e análise

A extensa pesquisa bibliográfica realizada obteve como resultados estudos de proteómica gerais, com a identificação de números elevados de proteínas orais em DMT2 e estudos mais dirigidos, com a identificação de um número reduzido de proteínas orais em DMT2. Os estudos dirigidos pretenderam analisar proteínas que normalmente não são identificadas nos estudos gerais de proteómica e que poderão desempenhar um papel importante na patologia molecular da DMT2 na cavidade oral, uma vez que, normalmente, já existem evidências da sua possível implicação na doença. Por outro lado, o facto de o estudo ser dirigido por evidências prévias limita a capacidade de identificar novas funções e implicações moleculares. Outra das grandes limitações destes estudos é o reduzido número de proteínas que

identificam, não permitindo inferir conclusões significativas acerca das redes de sinalização moleculares orais da DMT2. Para contrariar este facto será vantajoso realizar estudos gerais de proteómica oral, mais abrangentes, com desenhos de estudo similares entre eles, de forma a identificar um vasto leque de proteínas e se poder relacionar as variações da expressão proteica na DMT2 relativamente ao Oraloma normal.

A heterogeneidade dos métodos de amostragem e análise dos dados dos estudos analisados torna difícil a sua interpretação e a execução de uma avaliação fidedigna dos resultados dos estudos.

4.1.5 Origem das proteínas orais da DMT2

A saliva analisada nos estudos de proteómica oral pode ser proveniente da secreção específica das glândulas salivares ou da mistura de fluídos orais presentes na cavidade oral dos indivíduos, bem como proteínas não exclusivas das secreções glandulares. Do total das proteínas orais da DMT2, 493 são provenientes de amostras de saliva total, 6 das glândulas parótidas, 4 das glândulas SM/SL (Figura 13). A análise das proteínas orais secretadas pelas glândulas salivares é relevante, uma vez que pode indicar algum tipo de alteração da secreção proteica de uma glândula salivar específica, decorrente de modificações sistémicas, como por exemplo a hiperglicemia (55). Esta análise poderá permitir identificar uma secreção glandular predominantemente alterada que possa indicar algum tipo de comprometimento da função da mesma e revelar-se um bom alvo terapêutico.

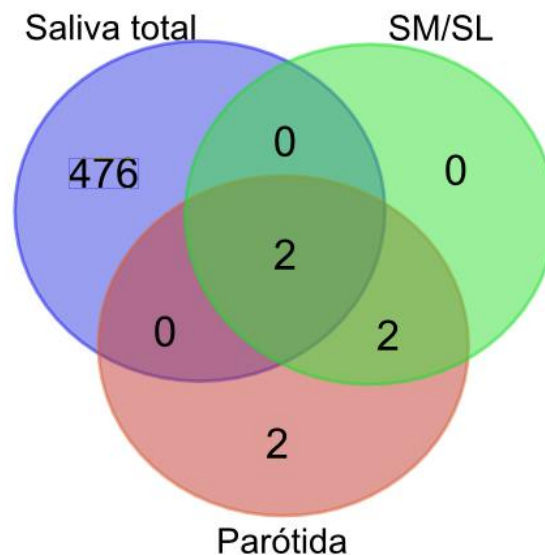


Figura 13 - Diagrama de Venn representativo da distribuição das proteínas salivares segundo a sua origem

A análise da Figura 13 permite verificar que existe previsivelmente um predomínio de proteínas identificadas a partir de estudos cuja amostra provém da saliva total, uma vez que a análise diretamente das glândulas salivares implica a remoção e análise de fragmentos glandulares. A identificação do proteoma salivar característico dos tecidos orais da DMT2 através de amostras de saliva exonencia o crescente papel da saliva como fluido para deteção de potenciais fatores patológicos e fisiológicos para o diagnóstico e tratamento da DMT2 (1).

4.1.6 Outras informações

Como referido na secção material e métodos, sub-secção “Outras informações”, foram também anotados outros tipos de informação considerados importantes para a análise e interpretação dos dados de proteómica. Foram, por exemplo, anotadas quais as proteínas de DMT2 que foram detectadas como estando glicosiladas na cavidade oral cuja informação é interpretada e discutida na secção “GlicoOraloma da DMT2”.

A sugestão de biomarcadores por parte dos autores dos artigos analisados também foi examinada. Neste seguimento, foram propostos por Border *et al* (2012) biomarcadores moleculares para a DMT2 na cavidade oral.

Os biomarcadores proteicos sobre regulados propostos por Border *et al* (2012) estão indicados na Figura 14 e os sub regulados estão indicados na Figura 15:

Gene	Protein	Function	Location	Glycosylation sites/ post-translational modifications	Sequence ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Independent of its glycolytic activity it is also involved in membrane trafficking in the early secretory pathway.	Cytoplasm. (Perinuclear region). Membrane. Note: postnuclear and perinuclear regions.	No glycosylation, but several other modifications including acetylation, methylation, phosphorylation, and deamidation. Reversible S-nitrosylation of Cys-152 inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation, which inhibits the enzyme in a non-reversible manner. The latter modification is more likely to be a pathophysiological event associated with inhibition of gluconeogenesis	P04406
SAA	Serum amyloid A protein	Major acute phase reactant. Apolipoprotein of the HDL complex.	Expressed by the liver; secreted in plasma.	N4,N4-dimethylasparagine	P02735
PIP	Prolactin-inducible protein	Inhibitor of T lymphocyte programmed cell death induced by cross-linking of CD4 and T-cell receptor; an aspartyl protease with specific fibronectin-degrading ability	Expressed in pathological conditions of the mammary gland and in several exocrine tissues, such as the lacrimal, salivary, and sweat glands	N-linked glycosylated	P12273

Figura 14- Tabela indicativa dos biomarcadores orais sobre regulados em pacientes com DMT2, sugeridos por Border *et al* (2012)

Gene	Protein	Function	Location	Glycosylation Sites	Sequence ID
CAH 6 ^r	Carbonic anhydrase	Reversible hydration of carbon dioxide. Its role in saliva is unknown.	Secreted/major constituent of saliva.	N/A	P23280
UTER	Uteroglobin	May bind androgens and other steroids, may also bind estramustine, a chemotherapeutic agent used for prostate cancer. May be under transcriptional regulation of steroid hormones.	Highest expression was found in skeletal muscle. Expressed as well in thymus, trachea, kidney, steroid responsive tissues (prostate, testis, uterus, breast and ovary) and salivary gland.	N/A	P11684
PLUNC ^r	Protein Plunc (palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated protein)	May be involved in the airway inflammatory response after exposure to irritants. May be associated with tumor progression. May play a role in innate immune responses of the upper airways.	Secreted/found in the nasal mucus. Apical side of airway epithelial cells. Detected in nasal mucus.	N/A	Q9NP55
AMY2B ^r	amylase 2B	Binds 1 calcium ion per subunit/ binds 1 chloride ion per subunit.	Secreted/parotid, salivary, pancreatic.	N-linked glycosylated	AAA51725
TRFE	Serotransferrin	Transferrins are iron binding transport proteins which can bind two Fe ³⁺ ions in association with the binding of an anion, usually bicarbonate. It is responsible for the transport of iron from sites of absorption and heme degradation to those of storage and utilization. Serum transferrin may also have a further role in stimulating cell proliferation.	Expressed by the liver and secreted in plasma.	N-linked and O-linked glycosylated, Phospho-Tyr, Omega-N-methylated Arg	P02787
AMY1	Alpha-amylase 1	Binds 1 calcium ion per subunit. Binds 1 chloride ion per subunit.	Secreted	N-linked glycosylated	Q68DX2
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	Is able to inhibit all four classes of proteinases by a unique 'trapping' mechanism. This protein has a peptide stretch, called the 'bait region' which contains specific cleavage sites for different proteinases. When a proteinase cleaves the bait region, a conformational change is induced in the protein which traps the proteinase. The entrapped enzyme remains active against low molecular weight substrates (activity against high molecular weight substrates is greatly reduced). Following cleavage in the bait region a thioester bond is hydrolyzed and mediates the covalent binding of the protein to the proteinase.	Secreted in plasma	N-linked glycosylated	P01023

Figura 15 - Tabela indicativa dos biomarcadores orais sub regulados em pacientes com DMT2, sugeridos por Border *et al* (2012)

Table 3 Diabetes-related biomarkers

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

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

Figura 16 - Tabela indicativa dos biomarcadores orais sub regulados em pacientes com DMT2, sugeridos por Border et al (2012) e por outros autores

O aumento da incidência e prevalência da DMT2 à escala mundial torna imperativa a realização de técnicas de diagnóstico precoce, de prevenção, e a implementação de terapêuticas adequadas de forma a aumentar a taxa de sobrevivência e qualidade de vida dos indivíduos. A descoberta de biomarcadores, que permitam o diagnóstico precoce da doença, avaliar a sua progressão ou que atuem como potenciais alvos terapêuticos pode ser um contributo fundamental para a avaliação e tratamento das suas complicações na cavidade oral. Qual a característica que torna uma proteína num biomarcador molecular fidedigno? A sua especificidade: o facto de poderem ser encontradas unicamente na DMT2, não sendo expressas em estados de saúde, ou aumentadas/diminuídas especificamente na DMT2, mesmo que estejam presentes também em estados de saúde. Será necessário inferir se o facto de estas proteínas estarem aumentadas/diminuídas poderá ser útil para o diagnóstico ou para o prognóstico das complicações orais da DMT2.

Os resultados de estudos como este amplificam a possibilidade de utilização da saliva como fluido de diagnóstico e monitorização dos estados de saúde e de doença, sendo obtida por métodos não invasivos, alternativamente ao sangue e aos seus componentes. No entanto, será necessária a validação destes biomarcadores propostos, através da realização de ensaios clínicos com populações maiores.

4.1.7 Caracterização funcional

4.1.7.1 Vias de sinalização das proteínas orais da DMT2

As proteínas orais da DMT2 foram catalogadas de acordo com a ontologia “*Pathways*”, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003), de acordo com “Material e Métodos – secção Caraterização funcional”. Esta análise permitiu catalogar as vias de sinalização em que participam a totalidade de proteínas orais identificadas nestes pacientes (Figura 17).

Pathways

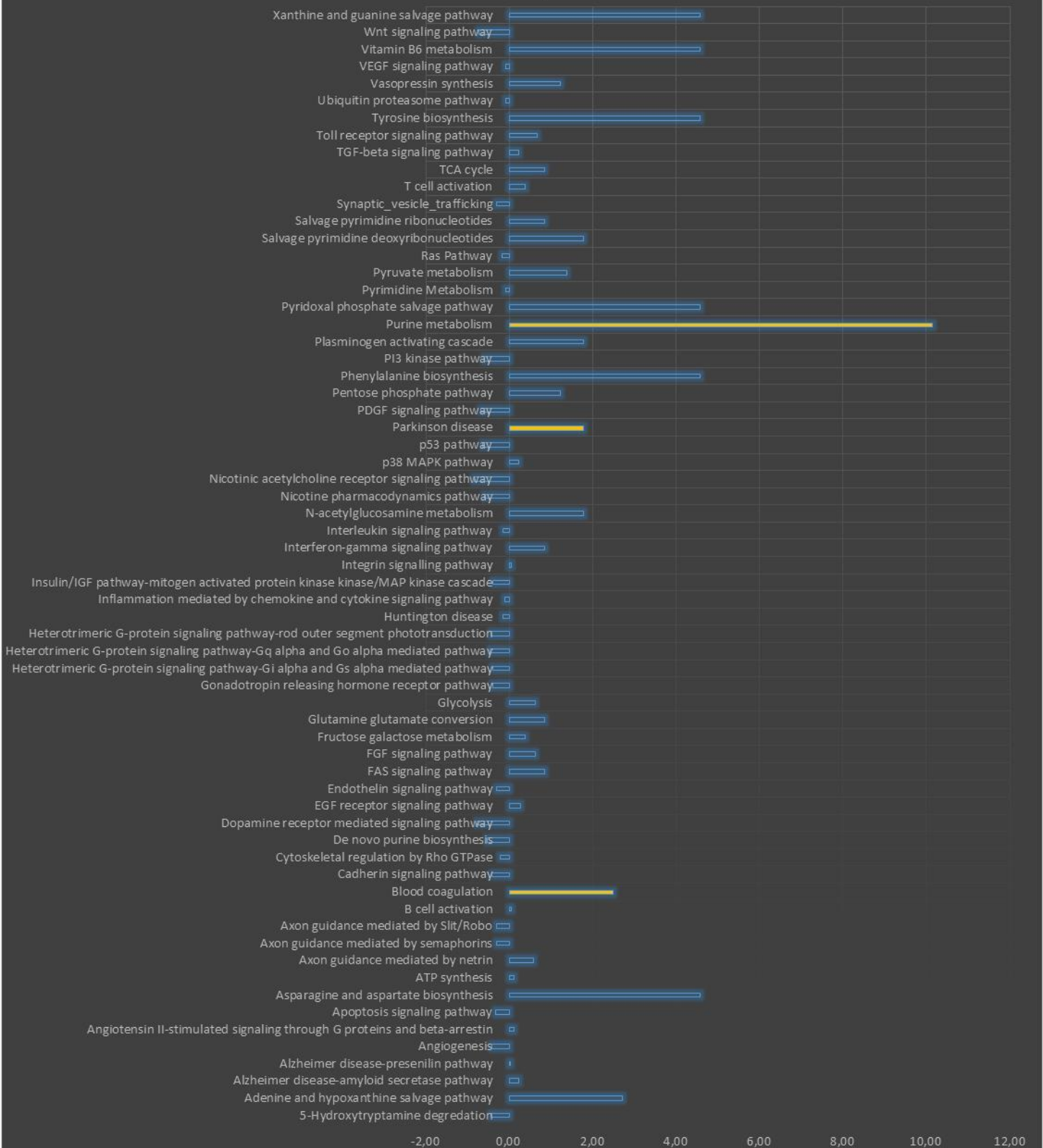


Figura 17 - Distribuição das proteínas identificadas em pacientes com DMT2 segundo as vias de sinalização em que participam, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003). É mostrada a diferença fraccional entre as proteínas de DMT2 e o OralOma normal. A amarelo estão indicadas as vias de sinalização com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$).

Pela análise da Figura 17 destacam-se com relevância estatística significativa para a DMT2 (barras coloridas a amarelo), alterações na *Blood coagulation*, com um $p\text{-value}<0,01$, na *Parkinson's Disease*, com um $p\text{-value}<0,01$ e no *Purine metabolism*, com um $p\text{-value}<0,02$, comparativamente com o Oraloma normal.

Na DMT2, o fenótipo hiperglicémico e a resistência à insulina, são responsáveis pelo desenvolvimento de uma tendência pró-trombótica multifactorial. Esta surge pela afeção de vários processos, nomeadamente a cascata de coagulação, a função endotelial, a adesividade plaquetária, a adesividade de monócitos, a função dos macrófagos e fibrinólise. Deste modo, indivíduos portadores desta patologia metabólica são caracterizados por disfunção endotelial, hiperactividade plaquetária, um estado de hipercoagulação associado a uma capacidade reduzida de fibrinólise, tal como descrito por Amaral D. (2011) (71). Os resultados expressos na Figura 17, indicativos de alterações significativas na via de sinalização da coagulação sanguínea, estão em concordância com os dados obtidos pelo estudo desenvolvido por Amaral D., em 2011 e conferem-lhe um forte peso estatístico.

Como referido anteriormente, uma das vias de sinalização mais alterada na DMT2 em relação ao Oraloma normal é a que envolve proteínas relacionadas com a doença de Parkinson. Isto parece sugerir uma estreita relação destas duas patologias. Efetivamente, sabe-se que a doença de Parkinson é caracterizada pela perda progressiva da função motora, com sintomas típicos de bradicinesia, tremores, rigidez e instabilidade postural, resultantes da degeneração e morte dos neurónios produtores de dopamina (neurotransmissor), numa região do cérebro, denominada substância nigra (72).

A relação desta patologia com a DMT2 tem vindo cada vez mais a ser objeto de estudo na comunidade científica (72). Pensa-se que a ligação entre as duas patologias possa estar relacionada com uma via de sinalização partilhada por ambas ou possa surgir como consequência indireta da hiperglicemia ou hiperinsulinemia crónicas, características da DMT2 (73). A hiperglicemia crónica promove o *stress oxidativo* e a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), implicadas na destruição das células β na DMT2. Este aumento da produção de ROS pode também ser promotor da

perda/destruição das células dopaminérgicas, no cérebro. A insulina pode atuar como um fator de crescimento no cérebro, pode reduzir o *stress* oxidativo e pode regular a concentração de dopamina. Em ratos, a elevação da concentração de glicose no sangue, a níveis equivalentes aos produzidos por uma refeição ou *stress*, suprimem a libertação de dopamina pelos neurónios da substância nigra e previnem ou revertem o aumento das taxas de libertação de células dopaminérgicas, normalmente realizadas pelo haloperidol (antagonista dos recetores de dopamina) (73). A resistência à insulina presente na DMT2 vai exponenciar o défice de transporte de insulina para o cérebro, diminuindo/suprimindo os níveis de dopamina (72).

Outros estudos indicam que a diabetes pode potenciar o desenvolvimento da doença de Parkinson através da inflamação, da doença cerebrovascular e da disfunção mitocondrial. A Diabetes é caracterizada por uma inflamação crónica de baixo grau e estudos recentes indicam que a neuroinflamação desempenha um papel importante na patogénese da Doença de Parkinson (72).

Os resultados de um estudo prospectivo desenvolvido por Driver *et al*, em 2011, indicam que a presença de DMT2 estava associada a um risco aumentado de desenvolvimento da doença de Parkinson, mas não sugerem que a diabetes seja um fator de risco precedente à doença de Parkinson (74). As conclusões de uma meta-análise desenvolvida por Cereda *et al*, em 2011, indicam que a Diabetes parece ser um fator de risco para o desenvolvimento da Doença de Parkinson (72).

Assim, depreende-se que a relação exata entre a diabetes e a doença de Parkinson ainda não está totalmente esclarecida, daí que seja necessária a realização de mais estudos que relacionem as moléculas comuns às duas patologias e possam contribuir para esta elucidação.

Relativamente à outra via de sinalização que mostrou estar significativamente alterada no diabético do tipo 2 relativamente ao OralOma normal, a via *Purine metabolism*, parecem não existir evidências que relacionem estas alterações com mecanismos fisiopatológicos da DMT2.

4.1.7.2 Processos biológicos das proteínas orais da DMT2

A identificação das proteínas salivares características dos tecidos orais da DMT2 permitiu a sua catalogação de acordo com a ontologia “*Biological Process*”, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003) de acordo com “Material e Métodos – secção Caracterização funcional”. Esta análise permitiu catalogar os processos biológicos em que intervêm o total das proteínas orais destes pacientes (Figura 18).

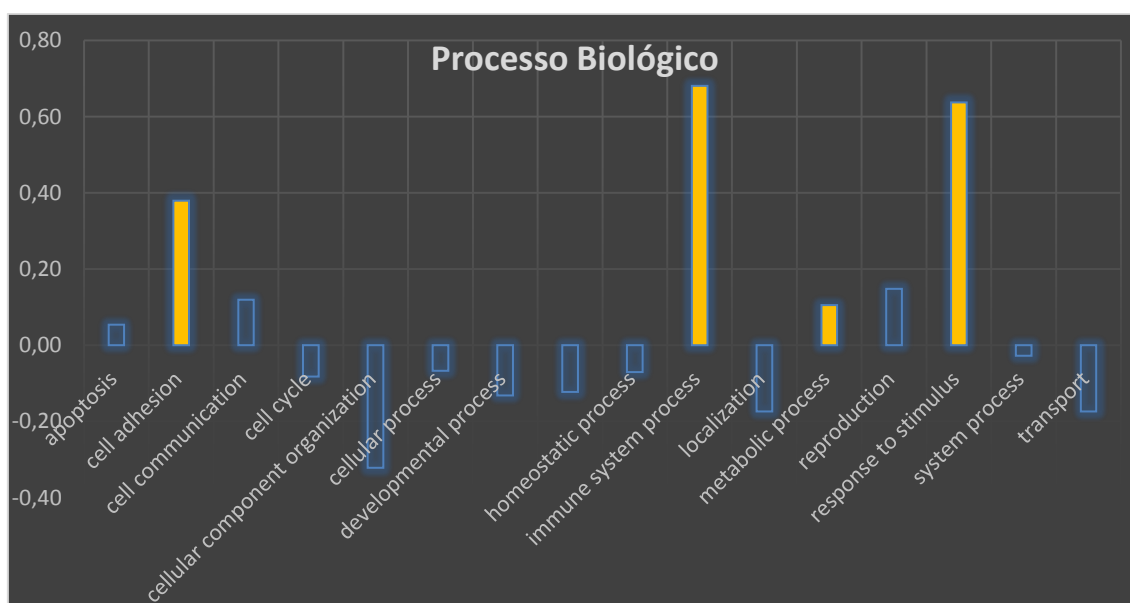


Figura 18 - Distribuição das proteínas salivares de pacientes com DMT2 segundo os processos biológicos em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003) . É mostrada a diferença fracional entre as proteínas de DMT2 e o OralOma normal. A laranja estão indicados os processos biológicos com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

A análise da Figura 18 permite inferir a existência de processos biológicos com aumentos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) na DMT2 (colunas com preenchimento a laranja), comparativamente com o Oraloma normal. A *response to stimulus* e o *immune system process* estão significativamente aumentados na DMT2 com um $p\text{-value} < 0,01$, a *cell adhesion* e o *metabolic process* possuem um $p\text{-value} < 0,02$.

A presença aumentada de proteínas pertencentes a estes processos biológicos alterados na diabetes é consistente com o conhecimento de que existe uma inflamação crónica de baixo grau associada persistência clínica da patologia e desenvolvimento de complicações (75).

O aumento dos níveis de proteínas orais que intervenham em processos de adesão celular aliado às alterações na composição e secreção das glândulas salivares características dos diabéticos, podem estar relacionadas com o aumento das colonizações oportunistas verificadas nestes pacientes.

Por outro lado, o aumento das proteínas envolvidas no metabolismo reflete, provavelmente, o aumento do metabolismo dos açúcares observado na DMT2 como consequência do estado hiperglicémico que a caracteriza.

4.1.7.3 Funções moleculares das proteínas salivares da DMT2

Os dados do proteoma oral dos pacientes com Diabetes Melitos tipo 2 foram catalogados de acordo com a ontologia “*Molecular Function*”, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003) de acordo com “Material e Métodos – secção Caraterização funcional”. Esta análise permitiu identificar as funções moleculares desempenhadas pelo total de proteínas orais identificadas nestes pacientes (Figura 19).

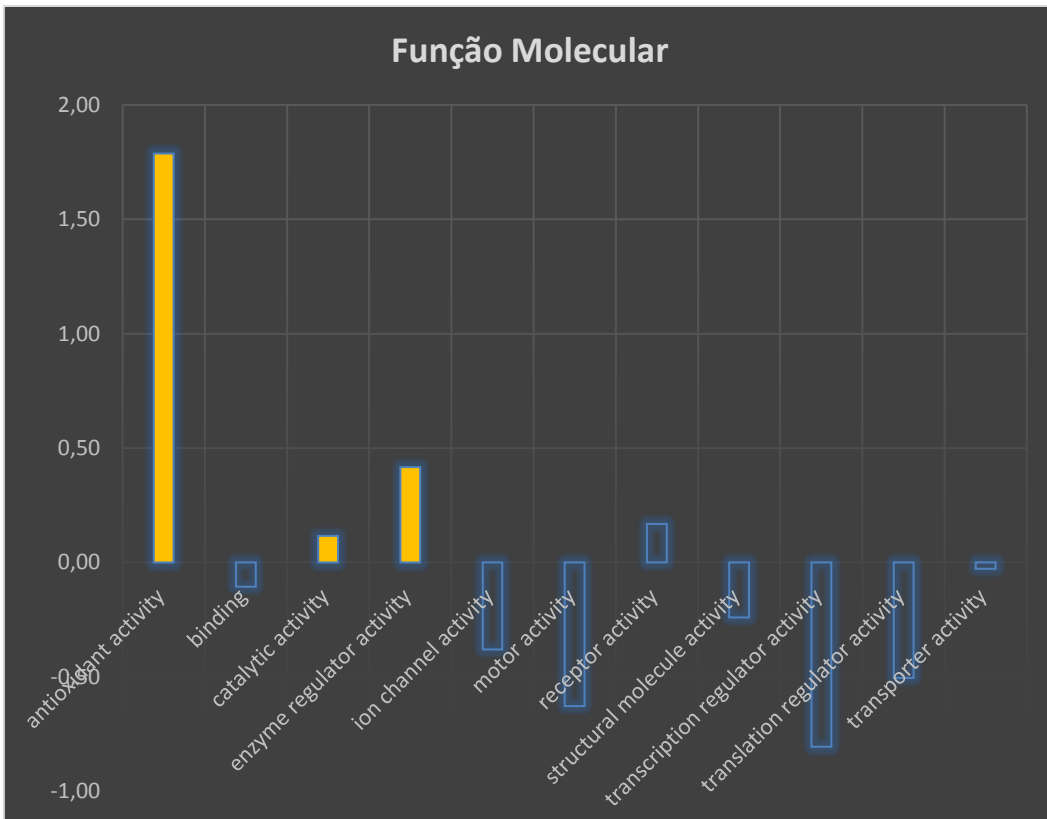


Figura 19 - Distribuição das proteínas salivares de pacientes com DMT2 segundo as funções moleculares que desempenham, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003). É mostrada a diferença fracional entre as proteínas de DMT2 e o OralOma normal. A laranja estão indicadas as funções moleculares com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

A análise da Figura 19 permite identificar as funções moleculares estatisticamente aumentadas na DMT2 (barras com coloração a laranja), comparativamente com o Oraloma normal. As proteínas orais com *antioxidant activity* possuem um aumento estatisticamente significativo na DMT2 com um $p\text{-value} < 0,01$, as envolvidas em funções de *catalytic activity* estão aumentadas em DMT2 com um $p\text{-value} < 0,05$ e por fim as que desempenham funções de *enzyme regulator activity* estão estatisticamente aumentadas com um $p\text{-value} < 0,02$.

A explicação para o aumento do número de proteínas orais com função antioxidante pode estar associada ao facto de os pacientes com Diabetes Melitos terem uma maior tendência a sofrer *stress* oxidativo. Nestes pacientes, o *stress* oxidativo atua inicialmente como um mediador da resistência à insulina, ajudando na sua progressão para a intolerância à glicose e posteriormente para a instalação da Diabetes, possivelmente contribuindo para

o aparecimento de inúmeras complicações micro e macro vasculares associadas esta patologia. O mecanismo preciso envolvido na resistência à insulina ainda não está totalmente esclarecido, mas infere-se que os níveis elevados de ácidos gordos livres, o *stress* oxidativo, a expressão genética alterada, a disfunção mitocondrial e a inflamação crónica subclínica possam ser os responsáveis (75). Bandeira *et al* (2012) defendem que a hiperglicemia pode ser considerada como geradora de *stress* oxidativo e que em certos casos de *stress* oxidativo severo podem ocorrer danos celulares capazes de provocar uma diminuição da função das células β pancreáticas (76). Será que as mesmas conclusões podem ser inferidas para a saliva destes pacientes? A saliva possui uma elevada percentagem de proteínas com ação antioxidante, pelo facto de a cavidade oral estar exposta a elevados níveis de *stress* oxidativo (37, 77). Estas proteínas modelam e controlam os danos oxidativos nos tecidos orais (78). Os resultados obtidos na figura 19 vão assim ao encontro do expectável: a presença de um elevado número de proteínas com ação antioxidante na saliva dos pacientes portadores de DMT2 de forma a combater o aumento e os danos provocados pelo *stress* oxidativo.

As proteínas orais com *catalytic activity* e *enzyme regulator activity* possuem funções redundantes e de amplo espectro, uma vez que muitas das proteínas com atividade catalítica, também possuem atividades de ligação, regulação enzimática, e vice-versa. A redundância destas duas categorias pertencentes à ontologia das funções moleculares do Panther dificulta a interpretação dos dados, comparativamente a funções mais específicas, como por exemplo a atividade antioxidante anteriormente descrita. No entanto, uma análise mais detalhada das subcategorias (PANTHER) das proteínas com catalítica permite tirar algumas elações acerca do papel destas proteínas na DMT2 (Figura 20):

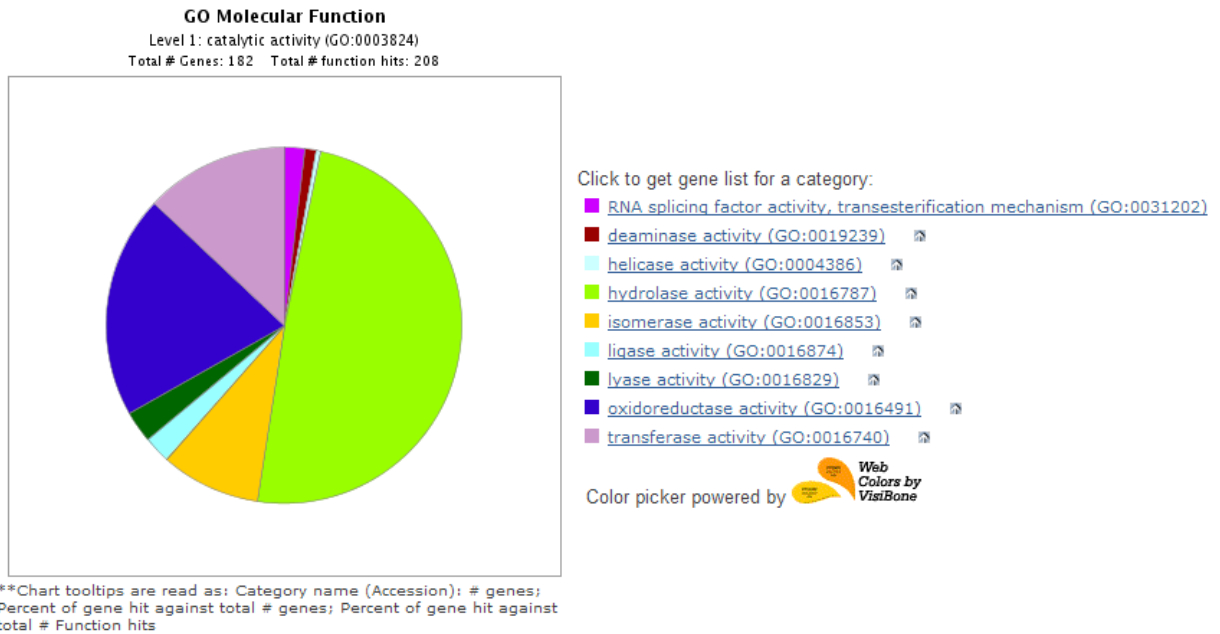


Figura 20- Gráfico representativo da distribuição das proteínas de DMT2 anotadas no nível 1 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER como tendo função catalítica.

A análise da Figura 20 indica que a vasta maioria das enzimas com atividade catalítica possuem atividade de hidrolase. Se avaliarmos a subdivisão (Panther) das enzimas que possuem atividade de hidrolase obtemos a seguinte figura (Figura 21):

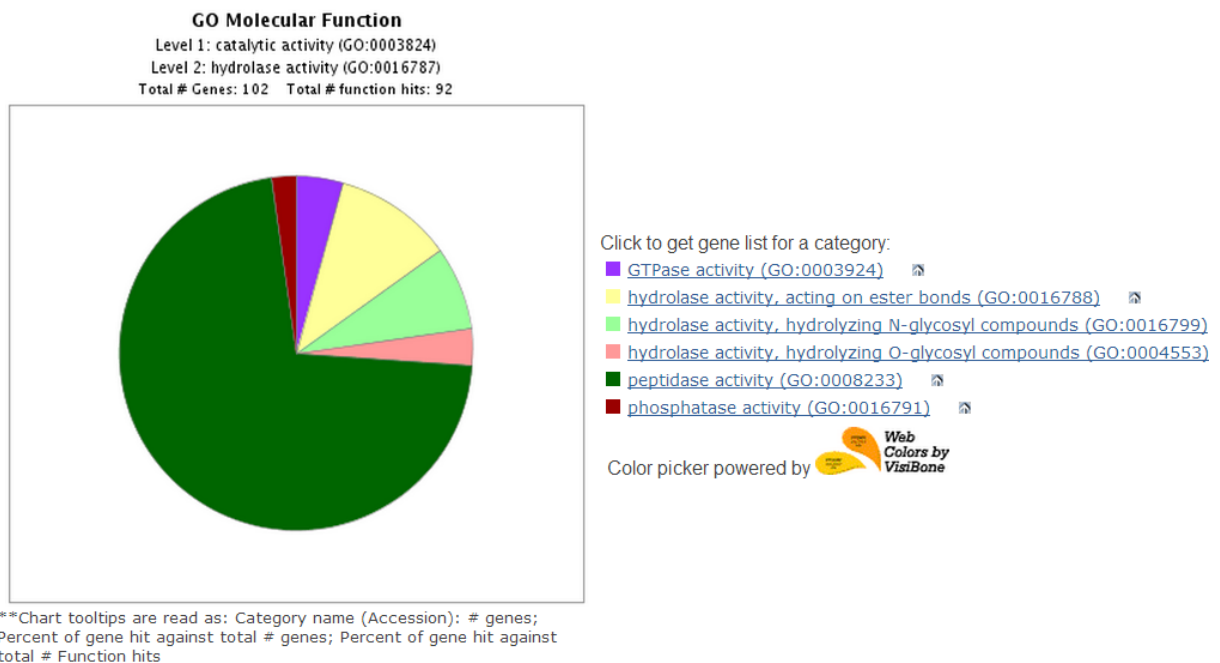


Figura 21 - Gráfico representativo da distribuição das proteínas de DMT2 anotadas no nível 2 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER como tendo função de hidrolase.

A presença predominante de enzimas com atividade de peptidase é consistente com o aumento estatisticamente significativo verificado na via de

sinalização da coagulação sanguínea, $p\text{-value}<0,01$, onde as peptidases desempenham um papel preponderante, tal como foi analisado em pormenor no estudo realizado por Amaral D. (2011). Este estudo identificou inibidores de proteases serínicas presentes na saliva de pacientes com DMT2 com a sua função comprometida, com conseqüente perturbação na formação do coágulo de fibrina e na sua fibrinólise.

As restantes proteínas pertencentes a esta subclasse estão maioritariamente relacionadas com o fenótipo hiperglicémico presente nos diabéticos, uma vez que são responsáveis pelo combate do excesso de glicose presente nos seus tecidos orais.

4.2 O supra-sistema oral na DMT2

4.2.1 Microbioma oral da DMT2

O conhecimento de que existem alterações do microbioma oral no paciente com DMT2 levou à realização de uma extensa análise de estudos experimentais com o objetivo de identificar os microrganismos predominantemente alterados na cavidade oral destes pacientes.

A tabela 2 indica a prevalência dos microrganismos encontrados nos tecidos orais do paciente com Diabetes Melitos tipo 2, resultantes da análise dos resultados de estudos experimentais.

Tabela 2 – Prevalência de microrganismos encontrados nos tecidos orais do paciente com Diabetes Melitos tipo 2, comparativamente a controlos sem DMT2, resultantes da análise dos resultados de estudos experimentais

Nome do microrganismo	Origem de origem da amostra	Prevalência na DMT2	Referência
<i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>	Sulcos subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Zonas de furca (molares)	↓	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Bolsas periodontais ≥ 5 mm	↓	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragengival	↓	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)

<i>Actinomyces naeslundii</i>	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Actinomyces spp.</i>	Sulcos subgengivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
<i>Campylobacter rectus</i>	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Campylobacter spp.</i>	Sulcos subgengivais	↔	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
<i>Candida</i>	Palato e mucosa oral	↑	Dorocka-Bobkowska B <i>et al</i> (2010) (33)
	Saliva total estimulada	↑	Sashikumar R e Kannan R (2010) (80)
	Saliva total não estimulada	↑	Sashikumar R e Kannan R (2010) (80)
	Saliva total	↑	Kumar BV <i>et al</i> (2005) (81)
<i>Candida spp.</i>	Saliva total estimulada	↓	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)
<i>Candida albicans</i>	Saliva total estimulada	↑	Tsang CS <i>et al</i> (2007) (82)
	Saliva total estimulada	↑	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)
	Zonas de furca (molares)	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Bolsas periodontais ≥ 5 mm	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
<i>Candida dubliniensis</i>	Zonas de furca (molares)	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Bolsas periodontais ≥ 5 mm	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
<i>Candida glabrata</i>	Zonas de furca (molares)	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Bolsas periodontais ≥ 5 mm	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Saliva total estimulada	↓	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)
<i>Candida kefyr</i>	Saliva total estimulada	↓	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)
<i>Candida krusei</i>	Saliva total estimulada	↓	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)
<i>Candida lipolytica</i>	Saliva total estimulada	↑	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)
<i>Candida parapsilosis</i>	Saliva total estimulada	↑	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)
<i>Candida stellatoidea</i>	Saliva total estimulada	↓	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)

<i>Candida tropicalis</i>	Zonas de furca (molares)	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Bolsas periodontais ≥ 5 mm	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Saliva total estimulada	↑	Bremenkamp RM <i>et al</i> (2011) (31)
<i>Capnocytophaga spp.</i>	Sulcos subgengivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
<i>Eikenella corrodens</i>	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragengival	↓	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Eubacterium spp.</i>	Sulcos subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa subgengival	↑	Kamaraj DR <i>et al</i> (2011) (83)
	Placa supragengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Língua	↓	Kamaraj DR <i>et al</i> (2011) (83)
<i>Fusobacterium spp.</i>	Sulcos subgengivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
<i>Lactobacilli > 10 CFU/1.5 cm²</i>	Saliva total	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Mutans streptococci > 20 CFU/1.5 cm²</i>	Saliva total	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Zonas de furca (molares)	↑	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Sulcos subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais ≥ 5 mm	↔	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa subgengival	↑	Kamaraj DR <i>et al</i> (2011) (83)
	Placa supragengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Língua	↑	Kamaraj DR <i>et al</i> (2011) (83)
<i>Prevotella intermedia</i>	Sulcos subgengivais	↔	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)

	Subgingival plaque	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	supragingival plaque	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Prevotella nigrescens</i>	Sulcos subgingivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgingivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Placa subgingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Selenomonas noxia</i>	Placa subgingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Sulcos subgingivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgingivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
<i>Streptococcus intermedius</i>	Placa subgingival	↓	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Streptococcus mutans</i>	Placa subgingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Streptococcus oralis</i>	Placa subgingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Placa subgingival	↓	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Streptococcus spp.</i>	Sulcos subgingivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgingivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
<i>Tannerella forsythia</i>	Zonas de furca (molares)	↓	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Sulcos subgingivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgingivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais ≥ 5 mm	↓	Sardi JC <i>et al</i> (2011) (30)
	Placa subgingival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa subgingival	↑	Kamaraj DR <i>et al</i> (2011) (83)
	Placa supragingival	↓	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Língua	↑	Kamaraj DR <i>et al</i> (2011) (83)
<i>Treponema denticola</i>	Sulcos subgingivais	↓	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)

	Bolsas periodontais subgengivais	↑	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
<i>Veillonella parvula</i>	Sulcos subgengivais	↔	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Bolsas periodontais subgengivais	↔	Ebersole JL <i>et al</i> (2008) (79)
	Placa subgengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
	Placa supragengival	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)
Yeasts \geq1 CFU/ml of oral rinse	Saliva total	↑	Hintao J <i>et al</i> (2007) (25)

Na tabela 2 foram incluídos os resultados de cerca de 9 estudos experimentais nos quais existe a comparação da prevalência de determinados microrganismos na cavidade oral de pacientes diabéticos tipo 2 com controlos saudáveis, sem DMT2. A escassez de estudos analisados surge da ausência de estudos experimentais com as características necessárias para a identificação do microbioma oral da DMT2. Os estudos disponíveis estão mais dirigidos para a deteção de microrganismos periodontopatogénicos nos tecidos orais de pacientes diabéticos, com um grupo de pacientes com doença periodontal e outro grupo sem doença periodontal, não existindo um grupo de controlo, sem diabetes.

As amostras analisadas nos estudos experimentais têm como origem os sulcos gengivais, as bolsas periodontais, bolsas periodontais com mais do que 5mm, zonas de furca de molares, placa subgengival, placa supragengival, palato, mucosa oral, língua e a saliva total (estimulada e não estimulada). Esta grande heterogeneidade dos locais de colheita das amostras determina a variabilidade na prevalência encontrada para um determinado microrganismo, uma vez que cada microrganismo pode ter um nicho e superfície colonizável preferencial. A prevalência de determinados microrganismos pode ainda ser influenciada pela exposição ao oxigénio por parte dos mesmos. Os aeróbios necessitam obrigatoriamente de oxigénio molecular para obter energia, daí que não seja espectável a sua presença em habitats com privação desta molécula. Os anaeróbios obrigatórios, por exemplo a *Porphyromonas gingivalis*, que requerem a ausência de oxigénio molecular não vão estar presentes em

grande número em zonas com elevado aporte desta molécula. Os anaeróbios facultativos, por exemplo o *Streptococcus mutans*, podem usar o oxigénio para obter energia ou sintetizá-la através de fenómenos de fermentação.

Da análise da tabela 2 há ainda que salientar a presença de determinados microrganismos, com locais de colheita específicos, apenas em estados de saúde, ou seja, nos grupos controlo sem DMT2 e outros apenas em estados de doença, ou seja, nos grupos com DMT2. A presença de determinados microrganismos exclusivamente na DMT2, em determinados *habitats*, como é o caso da *Candida glabrata* e da *Candida tropicalis* pode indicar que estas espécies possam ser consideradas espécies indicadoras orais da DMT2. Há, no entanto, que ter em consideração a limitação de estudos analisados, daí que seja necessário realizar mais estudos que possibilitem a validação destes possíveis espécies indicadoras.

Após a identificação do microbioma oral da DMT2 foram identificadas as proteínas produzidas pelos microrganismos orais e estas foram separadas de acordo com a sua capacidade de modificar açúcares (Figura 22).

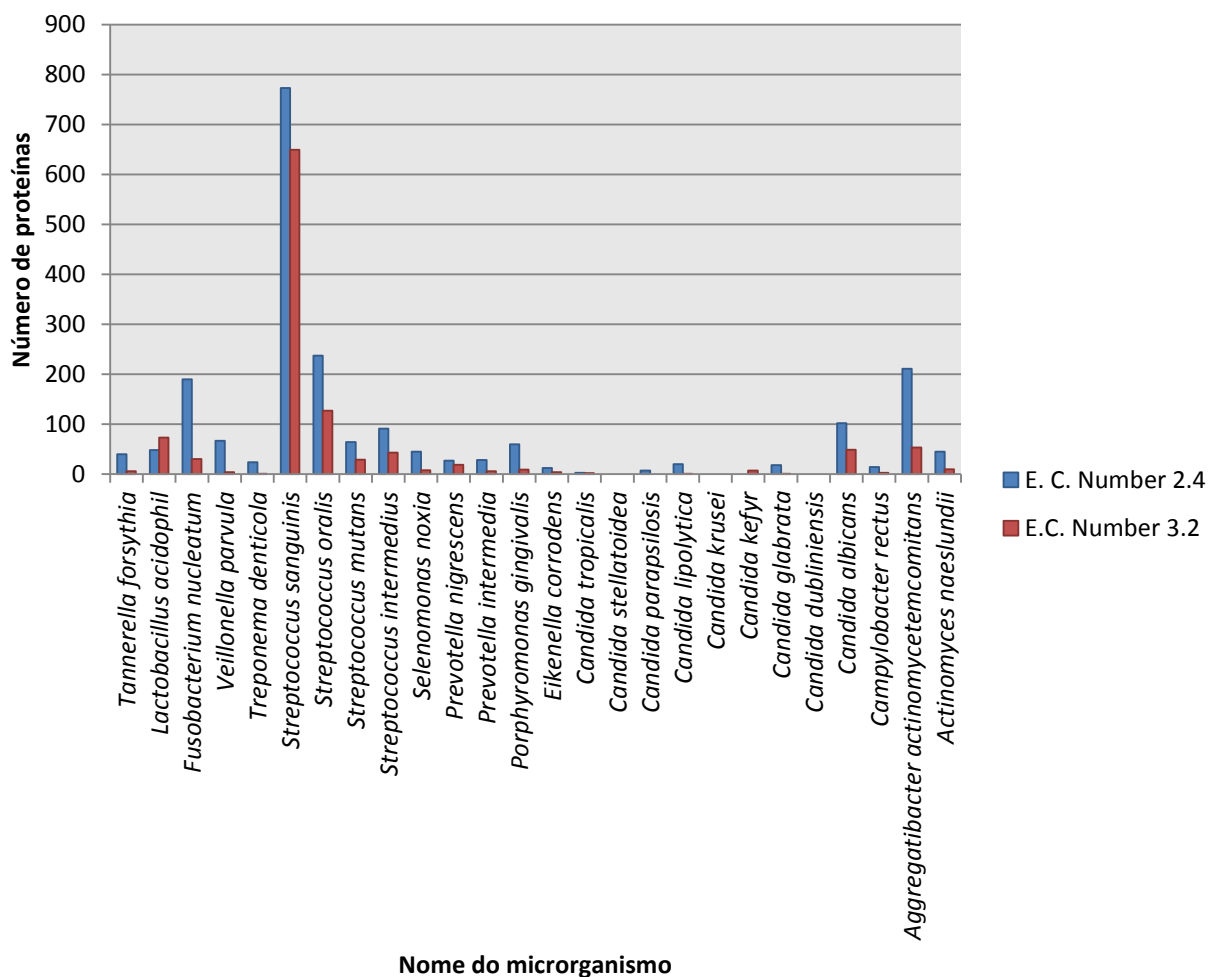


Figura 22 - Número de proteínas com E.C. Number 2.4 e 3.2 identificadas nos estudos que identificaram o microbioma da DMT2

Os valores elevados de proteínas classificadas com *EC Number* de 2.4 (glicosiltransferases) ou 3.2. (glicosilases) produzidas pelas espécies dos microrganismos podem ser justificados pelo tipo de metabolismo que estas possuem.

O conjunto de espécies sacarólicas presentes na figura 22 é constituído pelas espécies: *Treponema denticola*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Selenomonas noxia*, *Lactobacillus acidophil*. O conjunto de espécies assacarólicas presentes na figura 22 é constituído pelas espécies: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula*

(84). As espécies de *Candida* possuem actividade sacarolítica e assacarolítica (85).

A presença de valores elevados de proteínas com EC Number 2.4 e 3.2 por parte das espécies de *Streptococcus* pode ser justificada pelo seu metabolismo sacarolítico (glicose e os seus derivados). Para espécies como a *P. gingivalis*, com metabolismo assacarolítico (degradação de proteínas), a produção de elevados números de enzimas com capacidade de adicionar ou remover açúcares não será espectacular.

O aumento da prevalência de bactérias sacarolíticas, como por exemplo as espécies de *Streptococcus*, na placa supragengival, dos indivíduos com DMT2, ver tabela 2, aliado à disfunção salivar encontrada nestes pacientes, pode ser responsável por um incremento de incidência de cáries (9).

4.2.2 Interactoma microbioma-proteoma humano oral da DMT2

O conhecimento do papel das interacções do microbioma oral com o proteoma oral do hospedeiro tem uma importância vital para o entendimento dos mecanismos moleculares dos tecidos orais dos indivíduos. Estas interacções são importantes no estabelecimento e manutenção da flora oral capaz de desencadear a formação da placa bacteriana, responsável pelo desenvolvimento das cáries e da doença periodontal, bem como das alterações patológicas verificadas na diabetes melitos (66).

A identificação do proteoma oral da DMT2 permitiu fazer o levantamento das interacções que estas possuem com as proteínas bacterianas orais, através do algoritmo OralInt. A figura que se segue expõe essas mesmas as interacções em detalhe, através da ferramenta de visualização, Cytoscape (Figura 23):

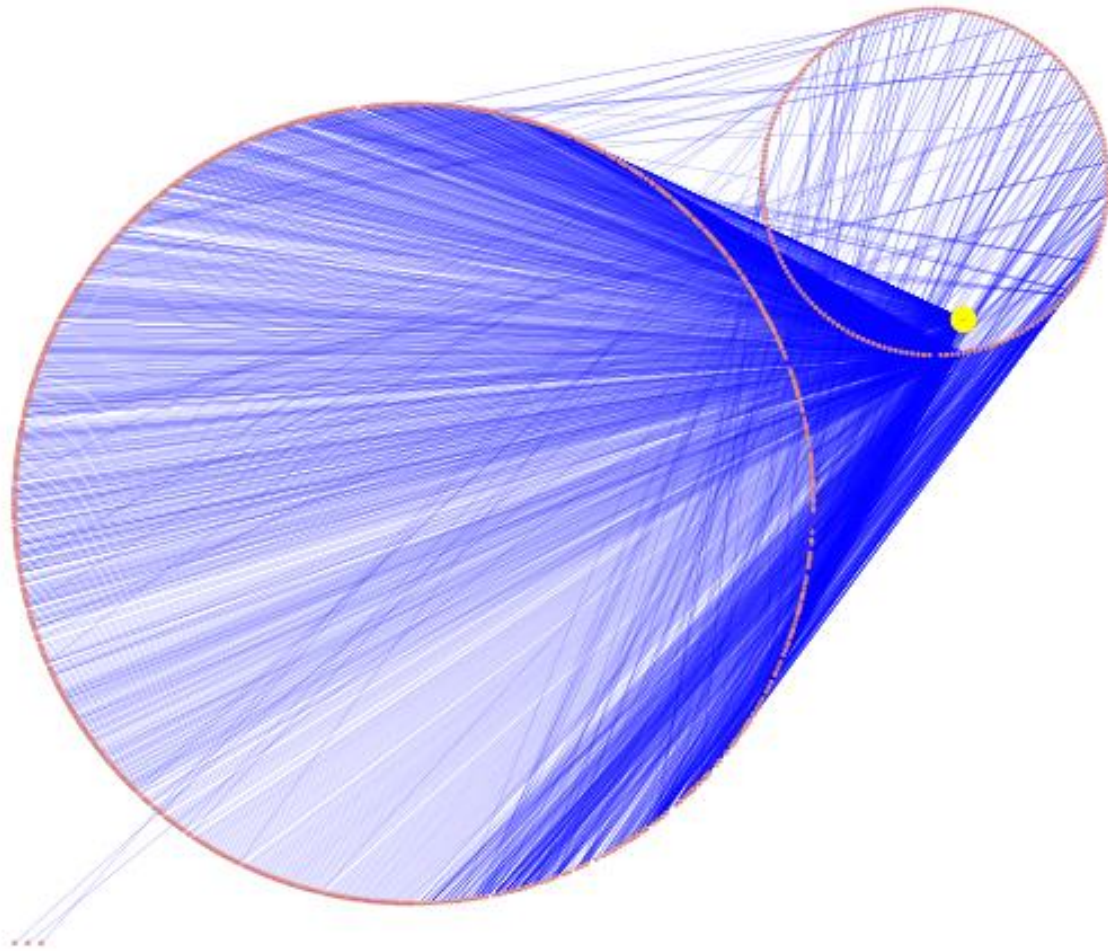


Figura 23 - Interações das proteínas orais da DMT2 (círculo mais à direita) com as proteínas bacterianas orais (círculo mais à esquerda), gerada através do algoritmo Orallnt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape

Na Figura 23, os pontos com coloração rosa, localizados no círculo mais à esquerda, representam as proteínas produzidas pelas bactérias orais que interagem (interação representada pelas linhas azuis) com as proteínas orais humanas da DMT2, também coradas a rosa e localizadas no círculo mais à direita, determinadas pelo algoritmo Orallnt. Na região mais à direita da figura 23 pode ainda verificar-se a presença de uma proteína humana em destaque (com preenchimento a amarelo). Esta representa a proteína oral humana da DMT2, a fibronectina, que possui a maior rede de interações com proteínas produzidas por microrganismos orais. Esta proteína humana está envolvida em processos de adesão celular e cicatrização, cujas alterações na DMT2 são estatisticamente significativas, ver figuras 18 e 17, respectivamente. A presença de um elevado número de interações desta proteína com proteínas produzidas pelas bactérias orais poderá estar relacionada com as alterações verificadas na DMT2.

A figura que se segue indica os géneros dos microrganismos orais que produzem um maior número de proteínas que interagem com proteínas orais humanas da DMT2 (Figura 24)

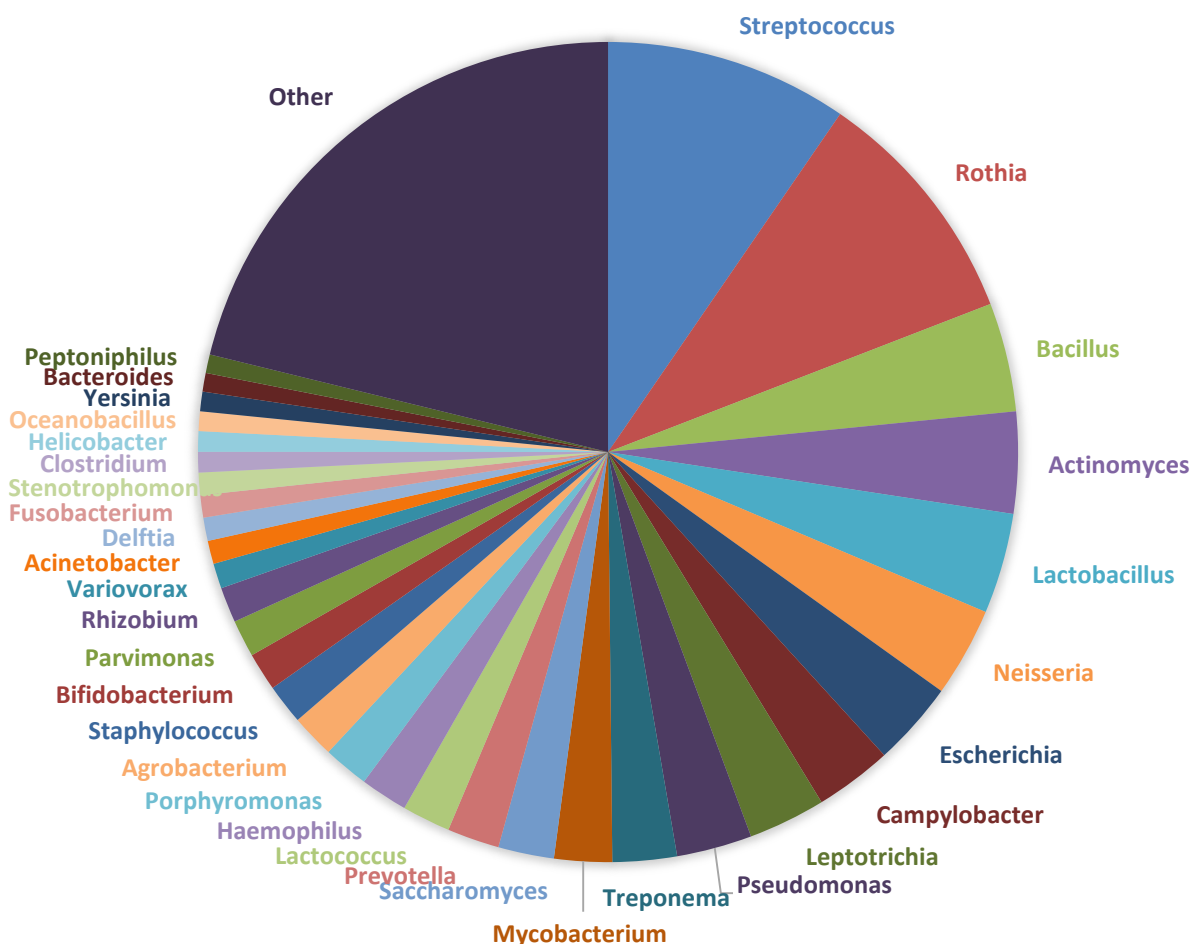


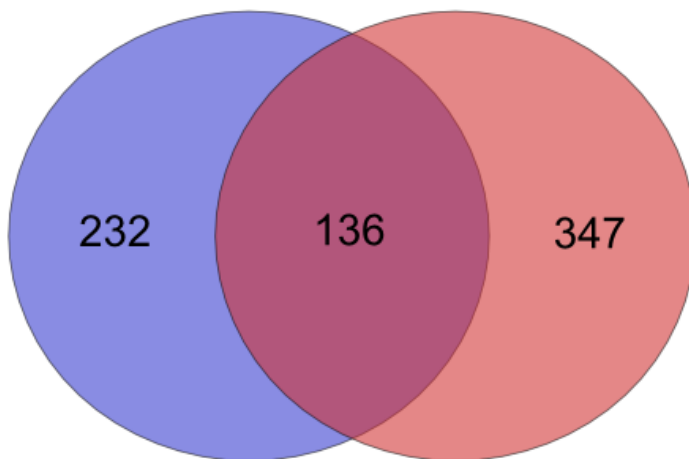
Figura 24 – Géneros dos microrganismos orais que produzem um maior número de proteínas que interagem com proteínas orais humanas da DMT2

A análise da figura 24 indica que o género em que existe maior produção de proteínas que interagem com proteínas humanas da DMT2 é *Streptococcus*. A fatia do gráfico que está legendada com o nome “others” representa o conjunto de géneros com produção de proteínas interactuantes com proteínas orais da DMT2 compreendidas entre 1 e 25 proteínas.

4.2.3 GlicoOraloma da DMT2

O GlicoOraloma da DMT2 representa o conjunto de proteínas orais humanas glicosiladas na totalidade de proteínas da DMT2. Para determinar este conjunto de proteínas, foi realizada uma pesquisa na base de dados do OralCard, onde estão depositadas todas as proteínas orais humanas que já foram encontradas glicosiladas na cavidade oral. Seguidamente foi realizado um cruzamento dessa lista de proteínas orais da DMT2. A figura que se segue indica as proteínas orais humanas glicosiladas na DMT2 (figura 25):

Proteínas glicosiladas na cavidade oral



Proteínas da cavidade oral da DMT2

Figura 25 - Diagrama de Venn representativo da intersecção da lista correspondente às proteínas orais glicosiladas presentes na cavidade oral (fonte OralCard) e da lista das proteínas orais da DMT2

A análise da figura 25 indica que existem cerca de 136 proteínas orais que poderão ser glicosiladas na DMT2 devido a glicosilações não enzimáticas provocadas pela hiperglicemia característica do diabético, bem como devido a glicosilações enzimáticas promovidas por enzimas produzidas pelos microrganismos que colonizam a cavidade oral dos diabéticos. Desta forma, verificou-se quais as proteínas bacterianas orais com capacidade glicosídica (glicosiltransferase – coloração a azul ou glicosidase – coloração a rosa) e que interagem com proteínas humanas orais da DMT2 (Tabela 3):

Tabela 3 - Proteínas bacterianas orais com capacidade glicosídica (glicosiltransferase – coloração a azul ou glicosidase – coloração a rosa) e que interagem com proteínas humanas orais da DMT2

Código UniprotKb	Nome das proteínas	Organismo	EC Number
A7BDN0	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB	<i>Actinomyces odontolyticus</i> ATCC 17982	2.4.1.18
A7BEJ4	Phosphorylase	<i>Actinomyces odontolyticus</i> ATCC 17982	2.4.1.1
Q5FLU0	Glycosyltransferase	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (strain ATCC 700396 / NCK56 / N2 / NCFM)	2.4.1.-
Q10641	Nicotinate phosphoribosyltransferase pncB1 (NAPRTase pncB1)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.4.2.11
A8SMD6	Uridine phosphorylase	<i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270	2.4.2.3
Q8DTV2	Orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) (OPRTase)	<i>Streptococcus mutans</i> serotype c (strain ATCC 700610 / UA159)	2.4.2.10
C2LR37	Glucosyltransferase-SI	<i>Streptococcus salivarius</i> SK126	2.4.1.5
C2LQ65	Levansucrase	<i>Streptococcus salivarius</i> SK126	2.4.1.10
C2LR38	Glucosyltransferase-SI	<i>Streptococcus salivarius</i> SK126	2.4.1.5
C2LR36	Glucosyltransferase-I	<i>Streptococcus salivarius</i> SK126	2.4.1.5
E2N015	Periplasmic beta-glucosidase	<i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612	3.2.1.21
D2BNN9	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fapy-DNA glycosylase)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (strain KF147)	3.2.2.23
C2LRH8	Alpha-amylase	<i>Streptococcus salivarius</i> SK126	3.2.1.1

A análise da tabela 3 indica que a produção de proteínas com capacidade glicosídica por parte dos microrganismos que interagem com as proteínas orais da DMT2 está fortemente relacionada com o seu tipo de metabolismo, sacarolítico ou assacarolítico.

5. Conclusão

Neste trabalho foi realizada uma análise de resultados de estudos de proteómica e microbiologia oral, com amostras obtidas da cavidade oral de indivíduos com DMT2, sendo realizada uma anotação manual de informações consideradas essenciais para a interpretação dos dados catalogados. Esta pesquisa permitiu a atualização da base de dados do OralCard.

A caracterização funcional do Oraloma da DMT2 permitiu inferir a presença de uma relação entre a DMT2 e a Doença de Parkinson, uma vez que na cavidade oral dos pacientes diabéticos existe um aumento estatisticamente significativo, $p\text{-value}<0,01$, da expressão de proteínas orais relacionadas com a Doença de Parkinson. A relação exata entre estas duas patologias ainda não está totalmente esclarecida, daí que seja necessária a realização de mais estudos que relacionem as moléculas comuns às duas patologias e possam contribuir para esta elucidação.

Verificou-se a presença de um elevado número de proteínas com ação antioxidante na saliva dos pacientes com DMT2, cujo aumento pode estar associado a um mecanismo usado pelo hospedeiro para combater *stress* oxidativo e os danos por ele provocados.

A presença predominante de enzimas com atividade de peptidase é consistente com o aumento estatisticamente significativo verificado na via da coagulação sanguínea, $p\text{-value}<0,01$. Existe ainda um aumento da expressão de proteínas responsáveis pelo metabolismo do excesso de glicose presente nos tecidos orais dos diabéticos.

No que concerne ao microbioma oral da DMT2, conclui-se que existe uma escassez de estudos experimentais com as características necessárias para a sua identificação. Ainda, assim, a presença de determinados microrganismos exclusivamente na DMT2, em determinados *habitats*, como é o caso da *Candida glabrata* e da *Candida tropicalis* pode indicar que estas espécies possam ser consideradas espécies com impacto na saúde oral do diabético do tipo 2.

A análise de interactómica oral da DMT2 mostrou que existe um elevado número de proteínas microbianas que interagem com um relativamente

reduzido número de proteínas orais humanas. A fibronectina é a proteína humana da DMT2 que possui a maior rede de interações com proteínas produzidas por microrganismos orais. Esta proteína humana está envolvida em processos de adesão celular e cicatrização, cujas alterações na DMT2 são estatisticamente significativas.

O género em que existe maior produção de proteínas que interagem com proteínas humanas da DMT2 é *Streptococcus*, sendo que a produção de proteínas com capacidade glicosídica por parte dos microrganismos que interagem com as proteínas orais da DMT2 está fortemente relacionada com o seu tipo de metabolismo, sacarolítico ou assacarolítico.

6. Bibliografia

1. Khan AR, Awan FR. Mining of protein based biomarkers for type 2 diabetes mellitus. *Pak J Pharm Sci.* 2012 Oct;25(4):889-901.
2. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. ADA - American Diabetes Association. January 2012;35(1).
3. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Dec;7(12):738-48.
4. Boavida J. M. FdAJP, Massano Cardoso S., Sequeira Duarte J., Duarte R., Ferreira H., Guerra F., Medina J. L., Nunes J. S., Pereira M., Raposo J. Diabetes: Factos e Números. Observatório Nacional da Diabetes, 2011.
5. Chan HH, Rahim ZH, Jessie K, Hashim OH, Taiyeb-Ali TB. Salivary proteins associated with periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4642-54.
6. Müller-Wieland BJGaD. Textbook of Type 2 Diabetes. United Kingdom: Martin Dunitz; 2003.
7. Isola M, Cossu M, Diana M, Isola R, Loy F, Solinas P, et al. Diabetes reduces statherin in human parotid: immunogold study and comparison with submandibular gland. *Oral Dis.* 2012 May;18(4):360-4.
8. Sanchez J-C, Corthals Garry, Hochstrasser. Biomedical Applications of Proteomics. 1st ed: WILEY-VCH; 2004.
9. Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2:3.
10. Leite RS, Marlow NM, Fernandes JK. Oral health and type 2 diabetes. *Am J Med Sci.* 2013 Apr;345(4):271-3.
11. Carranza F. A. NMG, Takei H. H. Carranza's Clinical Periodontology 9th Edition ed: W. B. Saunders Company; 2002.
12. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 2012 Jan;55(1):21-31.
13. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Leichter JW. Diabetes, periodontitis, and the subgingival microbiota. *J Oral Microbiol.* 2010;2.

14. Haseeb M, Khawaja KI, Ataullah K, Munir MB, Fatima A. Periodontal disease in type 2 diabetes mellitus. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2012 Aug;22(8):514-8.
15. Yoon MS, Jankowski V, Montag S, Zidek W, Henning L, Schluter H, et al. Characterisation of advanced glycation endproducts in saliva from patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 15;323(2):377-81.
16. Gurav A, Jadhav V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *J Diabetes*. 2011 Mar;3(1):21-8.
17. Engebretson S, Kocher T. Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2013 Apr;40 Suppl 14:S153-63.
18. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gomez de Ferraris ME, Peydro A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Jul;11(4):E309-14.
19. Jurysta C, Bulur N, Oguzhan B, Satman I, Yilmaz TM, Malaisse WJ, et al. Salivary glucose concentration and excretion in normal and diabetic subjects. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:430426.
20. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):137-43.
21. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010 Oct;192(19):5002-17.
22. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol*. 2003 Jul;30(7):644-54.
23. Zhou M, Rong R, Munro D, Zhu C, Gao X, Zhang Q, et al. Investigation of the Effect of Type 2 Diabetes Mellitus on Subgingival Plaque Microbiota by High-Throughput 16S rDNA Pyrosequencing. *PLoS One*. 2013;8(4):e61516.
24. Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontal Res*. 2012 Aug;47(4):470-8.
25. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Jun;22(3):175-81.

26. Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. *Mycoses*. 2004 Aug;47(7):315-8.
27. Sardi JC, Duque C, Hoffling JF, Goncalves RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Med Mycol*. 2012 Jul;50(5):467-75.
28. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Marques MR, Hoffling JF, Goncalves RB. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. *Med Mycol*. 2012 Jan;50(1):43-9.
29. Melton JJ, Redding SW, Kirkpatrick WR, Reasner CA, Ocampo GL, Venkatesh A, et al. Recovery of *Candida dubliniensis* and other *Candida* species from the oral cavity of subjects with periodontitis who had well-controlled and poorly controlled type 2 diabetes: a pilot study. *Spec Care Dentist*. 2010 Nov-Dec;30(6):230-4.
30. Sardi JC, Duque C, Camargo GA, Hoffling JF, Goncalves RB. Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis--a pilot study. *Arch Oral Biol*. 2011 Oct;56(10):1098-105.
31. Bremenkamp RM, Caris AR, Jorge AO, Back-Brito GN, Mota AJ, Balducci I, et al. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol*. 2011 Jun;56(6):549-55.
32. Sanita PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jun;111(6):726-33.
33. Dorocka-Bobkowska B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B, Hedzelek W, Szumala-Kakol A, Budtz-Jorgensen E. *Candida*-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Oct;90(1):81-6.
34. Abiko Y, Selimovic D. The mechanism of protracted wound healing on oral mucosa in diabetes. Review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2010 Aug;10(3):186-91.

35. Beikler T, Flemmig TF. Implants in the medically compromised patient. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):305-16.
36. Silva A. M. S. CGC, Reis E. M. Proteômica - Uma abordagem funcional do estudo do genoma. *Saúde e Ambiente em Revista.* 2007;2(2):1-10.
37. 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 Jul;57(7):853-64.
38. Korc M. Diabetes mellitus in the era of proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2003 Jun;2(6):399-404.
39. Campo J, Perea MA, del Romero J, Cano J, Hernando V, Bascones A. Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. *Oral Dis.* 2006 May;12(3):219-28.
40. Arrais JP, Rosa N, Melo J, Coelho ED, Amaral D, Correia MJ, et al. OralCard: A bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Arch Oral Biol.* 2013 Feb 7.
41. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.* 2010 Feb;4(1):171-89.
42. Petrescu S. Glycosilation. 1st ed: InTech; 2012 September.
43. Wilhelm von der Lieth Claus LT, Frank Martin. *Bioinformatics for Glycobiology and Glycomics: Wiley-Blackwell; 2009.*
44. Wormald MR, Petrescu AJ, Pao YL, Glithero A, Elliott T, Dwek RA. Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling. *Chem Rev.* 2002 Feb;102(2):371-86.
45. Rudd PM, Dwek RA. Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1997;32(1):1-100.
46. Messner P. Bacterial glycoproteins. *Glycoconj J.* 1997 Jan;14(1):3-11.
47. Walsh C. *Posttranslational modification of proteins : expanding nature's inventory: Englewood, Colo. : Roberts and Co. Publishers; 2006. 490 p.*
48. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002 Apr;12(4):43R-56R.

49. Rabinovich GA, van Kooyk Y, Cobb BA. Glycobiology of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1253:1-15.
50. Kreisman LS, Cobb BA. Infection, inflammation and host carbohydrates: a Glyco-Evasion Hypothesis. *Glycobiology.* 2012 Aug;22(8):1019-30.
51. Mi H, Guo N, Kejariwal A, Thomas PD. PANTHER version 6: protein sequence and function evolution data with expanded representation of biological pathways. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D247-52. PubMed PMID: 17130144.
52. Cho RJ, Campbell MJ. Transcription, genomes, function. *Trends Genet.* 2000 Sep;16(9):409-15.
53. Consortium TU. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Research.* 2013;41(D1):D43-D7.
54. Schomburg I, Chang A, Placzek S, Sohngen C, Rother M, Lang M, et al. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D764-72. PubMed PMID: 23203881. Pubmed Central PMCID: 3531171.
55. Border MB, Schwartz S, Carlson J, Dibble CF, Kohlfarber H, Offenbacher S, et al. Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes. *Mol Biosyst.* 2012 Apr;8(4):1304-10.
56. Yin J, Gao H, Yang J, Xu L, Li M. Measurement of salivary resistin level in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:359724.
57. Yuan J, Dunn P, Martinus RD. Detection of Hsp60 in saliva and serum from type 2 diabetic and non-diabetic control subjects. *Cell Stress Chaperones.* 2011 Nov;16(6):689-93.
58. Isola M, Lantini M, Solinas P, Diana M, Isola R, Loy F, et al. Diabetes affects statherin expression in human labial glands. *Oral Dis.* 2011 Oct;17(7):685-9.
59. Isola M, Solinas P, Proto E, Cossu M, Lantini MS. Reduced statherin reactivity of human submandibular gland in diabetes. *Oral Dis.* 2011 Mar;17(2):217-20.
60. Oxford GE, Tayari L, Barfoot MD, Peck AB, Tanaka Y, Humphreys-Beher MG. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 2000 May-Jun;14(3):140-5.

61. Soell M, Feki A, Hannig M, Sano H, Pinget M, Selimovic D. Chromogranin A detection in saliva of type 2 diabetes patients. *Bosn J Basic Med Sci.* 2010 Feb;10(1):2-8.
62. Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000 Oct;28(5):373-81.
63. Aydin S. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *J Biochem Mol Biol.* 2007 Jan 31;40(1):29-35.
64. Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Ronka H, et al. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res.* 2000 Oct;35(5):259-65.
65. Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SL, Grisi MF, et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol.* 2010 Mar;81(3):384-91.
66. Rogers JD, Palmer RJ, Jr., Kolenbrander PE, Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun.* 2001 Nov;69(11):7046-56.
67. Baik JE, Hong SW, Choi S, Jeon JH, Park OJ, Cho K, et al. Alpha-amylase is a human salivary protein with affinity to lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol.* 2013 Apr;28(2):142-53.
68. Choi S, Baik JE, Jeon JH, Cho K, Seo DG, Kum KY, et al. Identification of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-binding proteins in human saliva. *Mol Immunol.* 2011 Sep;48(15-16):2207-13.
69. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. *J Clin Periodontol.* 2013 Feb;40(2):140-7.
70. Chang SA. Smoking and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab J.* 2012 Dec;36(6):399-403. PubMed PMID: 23275932.
71. Amaral D. Estudo in Silico de Mecanismos Moleculares da Coagulação/Fibrinólise Envolvidos no processo de Cicatrização na Diabetes

Melitos tipo 2 - Implicações na Saúde Oral: Universidade Católica Portuguesa - Centro Regional das Beiras; 2011.

72. Cereda E, Barichella M, Pedrolli C, Klersy C, Cassani E, Caccialanza R, et al. Diabetes and risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2011 Dec;34(12):2614-23. PubMed PMID: 22110170.
73. Aviles-Olmos I, Limousin P, Lees A, Foltynie T. Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection. *Brain*. 2013 Feb;136(Pt 2):374-84.
74. Driver JA, Smith A, Buring JE, Gaziano JM, Kurth T, Logroscino G. Prospective cohort study of type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care*. 2008 Oct;31(10):2003-5. PubMed PMID: 18599528.
75. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. *Curr Diab Rep*. 2013 Jun;13(3):435-44.
76. Bandeira Sde M, Guedes Gda S, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, et al. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:819310.
77. Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Spinu T, Totan C, et al. Could constitute saliva the first line of defence against oxidative stress? *Rom J Intern Med*. 2007;45(2):209-13.
78. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol*. 2002 Mar;29(3):189-94.
79. Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2008 Apr;79(4):637-46. PubMed PMID: 18380556.
80. Sashikumar R, Kannan R. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 May;109(5):706-11. PubMed PMID: 20416536.
81. Kumar BV, Padshetty NS, Bai KY, Rao MS. Prevalence of Candida in the oral cavity of diabetic subjects. *J Assoc Physicians India*. 2005 Jul;53:599-602. PubMed PMID: 16190127.
82. Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans*

isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol.* 2007 Oct;56(Pt 10):1393-8.

83. Kamaraj DR, Bhushan KS, Laxman VK, Mathew J. Detection of odoriferous subgingival and tongue microbiota in diabetic and nondiabetic patients with oral malodor using polymerase chain reaction. *Indian J Dent Res.* 2011 Mar-Apr;22(2):260-5.

84. Dumitrescu AeO, Masaru. *Periodontal Microbiology. Etiology and Pathogenesis of Periodontal Disease*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. p. 39-76.

85. Samaranayake YH, MacFarlane TW, Samaranayake LP, Aitchison T. The in vitro proteolytic and saccharolytic activity of *Candida* species cultured in human saliva. *Oral Microbiol Immunol.* 1994 Aug;9(4):229-35.

7. Anexos

Tabela A

Lista de proteínas orais da Diabetes Melitos tipo 2 identificadas até ao momento na cavidade oral e depositadas na base de dados do OralCard (**Tabela A**).

Q53EP0			x	x	-2,17	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q5F1R6			x	x	-9,81	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q8NGY0			x	x	-9,18	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q8TAX7			x	x	-4,43	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q99102			x	x	13,17	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q9HC84			x	x	-2,16	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q9HC84			x	x	-1,82	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q9UIV8			x	x	6,54	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q9Y5J9			x	x	1,90	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q6CRY5			x	x	702,46	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
Q92210			x	x	4,32	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)				22314925
P10809			x	x	4,25	18-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Other studies on HSPs have attempted to control for environmental stresses by asking patients to refrain from exertion, smoking, caffeine and alcohol for 2–24 h and not taking samples from subjects with active bacterial or viral infection or other illness. Similar restrictions were applied to our participants.	ELISA				21748374
P01133			x	x	1,21	7 years old; f	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were instructed to expectorate every 6 h into pre-labeled sterile collection tubes. Unstimulated whole resting saliva (approximately 3 ml) was obtained from each patient by passive expectoration at 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 and 42 h. Patients were asked to collect approximately 3 ml of whole saliva without the assistance of chewing material. No time limit was enforced to collect the requested volume of material. Samples were stored at 420°C until evaluated.	Quantikine Human EGF Immunoassay				10989322
P10645			x	x	9,50		MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Saliva samples were taken from ST patients each with or without diabetes type Q. All samples were taken without oral salivary gland stimulation. The patients were instructed to salivate directly into Falcon tubes (Falcon 15 ml, Germany) including 100 µl RL (QV,Qf,Qd) buffer with protease inhibitors (Complete cocktail tablets, Roche, Germany) for preserving proteins from degradation processes.	Electrophoresis		biomarker f	20192923	

P02768		x		x	1,42	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA				11014514
Q9UBU3			x	x	-2,10	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomical status was similar for both groups (survey data).	Ghrelin was measured in unstimulated total saliva using the same human-ghrelin-RIA kit, which is designed to test any biological fluid with sufficient levels of the peptide to be determined.				17244479
Q9UBU3			x	x	-1,32	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomical status was similar for both groups (survey data).	Ghrelin was measured in unstimulated total saliva using the same human-ghrelin-RIA kit, which is designed to test any biological fluid with sufficient levels of the peptide to be determined.				17244479
Q9UBU3			x	x	-1,63	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomical status was similar for both groups (survey data).	Ghrelin was measured in unstimulated total saliva using the same human-ghrelin-RIA kit, which is designed to test any biological fluid with sufficient levels of the peptide to be determined.				17244479
Q9UBU3			x	x	-1,23	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomical status was similar for both groups (survey data).	Ghrelin was measured in unstimulated total saliva using the same human-ghrelin-RIA kit, which is designed to test any biological fluid with sufficient levels of the peptide to be determined.				17244479
P04745			x	x	1,25	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomical status was similar for both groups (survey data).	amylase activity was determined by the colorimetric method of Winn-Deen and coworkers				17244479
P04745			x	x	1,24	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomical status was similar for both groups (survey data).	amylase activity was determined by the colorimetric method of Winn-Deen and coworkers				17244479
P02768			x	x	1,19	45-64	MF	The study included patientes with habits of smoking and alcohol consumption	Subjects were told not to eat or smoke for one hour prior to the examination.	colorimetric methods				11005153
P04745			x	x	1,14	45-64	MF	The study included patientes with habits of smoking and alcohol consumption	Subjects were told not to eat or smoke for one hour prior to the examination.	Boehringer MPR 3 a-amylase EPS method				11005153
P05231			x	x	0,00	35-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects refrained from eating, drinking, and oral hygiene for 2 hours prior to saliva collection.	ELISA				20192865