

U. PORTO



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Saliva como Ferramenta de Diagnóstico de Patologias do Trato Gastrointestinal

Artigo de Revisão Bibliográfica

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Miguel Alcino Ramos Faria Coelho

Porto, 2018



MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**“SALIVA COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO DE PATOLOGIAS DO TRATO
GASTROINTESTINAL”**

MIGUEL ALCINO RAMOS FARIA COELHO

Estudante do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Up201305542@fmd.up.pt

***Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade
do Porto no âmbito da UC “Monografia de Investigação / Relatório de
Atividade Clínica”***

Orientador

João Miguel Silva e Costa Rodrigues

Professor Auxiliar Convidado com Agregação da Faculdade de Medicina Dentária da

Universidade do Porto

Porto, 2018

Resumo

A cavidade oral tem uma íntima relação com todo o trato gastrointestinal, constituindo a sua porta de entrada e início de comunicação e relação com os fatores exógenos. A saliva é um fluido corporal, de composição rica e variada, especialmente preponderante e informativo na interação da cavidade oral com o trato gastrointestinal. É possível estabelecer um elo de ligação e comparação entre o sangue periférico e a saliva, no que concerne a diferentes estados fisiológicos e patológicos do organismo, e inúmeros estudos demonstraram já que componentes da saliva, como metabolitos e proteínas, podem ser usados para avaliar e detetar patologias locais e sistémicas diversas, nomeadamente, do trato gastrointestinal e glândulas acessórias, com maior expressão nos cancros esofágico, gástrico e pancreático, doença celíaca e doenças inflamatórias intestinais (colite ulcerosa e doença de Crohn). A pesquisa bibliográfica foi realizada através da base de dados online *Pubmed*, onde foram selecionados e analisados artigos de interesse científico relevante, adicionalmente, alguns livros científicos e trabalhos académicos de conteúdo considerado complementar foram também consultados. Os resultados obtidos revelam-se promissores, embora as diversas investigações sejam contundentes ao afirmar que a realização de mais estudos será necessária e imprescindível para sustentar as suas observações. Assim, partindo-se de um padrão de referência, interpretações qualitativas e quantitativas de marcadores biológicos salivares poderão confirmar ou reforçar diagnósticos e contribuir de sobremaneira para a deteção precoce de patologias do trato gastrointestinal, funcionando como uma ferramenta de diagnóstico acessível e não invasiva.

Palavras-chave: doenças gastrointestinais e biomarcadores salivares; cancro pancreático e saliva; cancro gástrico e saliva; cancro esofágico e saliva; doenças inflamatórias intestinais e saliva; doença celíaca e saliva; biomarcadores salivares; cancro gastrointestinal; doenças inflamatórias intestinais; doença celíaca.

Abstract

The oral cavity has an intimate relationship with the entire gastrointestinal tract, constituting its entrance door and the beginning of communication and relationship with exogenous factors. Saliva is a body fluid, with a rich and varied composition, especially important and informative on the interaction of the oral cavity with the gastrointestinal tract. It is possible to establish a relatively strong link between the peripheral blood and saliva, in what concerns the different physiological and pathological states of the organism. Several studies have demonstrated that components of saliva, as metabolites and proteins, can be used to assess and detect various local and systemic pathologies, in particular, gastrointestinal tract and accessory glands diseases, such as esophageal, gastric and pancreatic cancers, celiac disease and inflammatory bowel disease (namely, ulcerative colitis and Crohn's disease). The bibliographic research was performed using the Pubmed online database, where articles of scientific interest were selected and analyzed, additionally, some scientific books and academic works of content considered relevant were also consulted. The results obtained are promising, although the different groups of investigation are assertive in saying that further studies will be necessary and indispensable to sustain and support their observations. Therefore, having standard references, qualitative and quantitative interpretations of salivary biomarkers may confirm or strengthen diagnoses and contribute greatly to the early detection of gastrointestinal tract diseases, functioning as an accessible and non-invasive diagnostic tool.

Keywords: gastrointestinal diseases and saliva biomarkers; pancreatic cancer and saliva; gastric cancer and saliva; esophageal cancer and saliva; inflammatory bowel disease and saliva; celiac disease and saliva; salivary biomarkers; gastrointestinal cancer; inflammatory bowel disease; celiac disease.

Agradecimentos

Ao meu Orientador,

o Professor Dr. João Rodrigues, quero demonstrar a minha grande e inexorável admiração, não só por toda a paciência, dedicação, atenção, compreensão, empenho, disponibilidade e auxílio na concretização do presente trabalho, mas também por ter marcado de forma tão positiva e alegre o meu primeiro contacto com o ensino superior, jamais esquecerei as aulas de Bioquímica por si lecionadas. Por tudo isto e mais, o meu Muito Obrigado, Professor!

À minha Família,

Com destaque claro e incontornável para os meus Pais. Mãe e Pai, Pai e Mãe, a vós devo tudo, como sabem.... Agradeço-vos por toda a dedicação, devoção, superação, acreditar, humildade e apoio e amor incondicionais! Obrigado por me terem oferecido o Livro da Minha Vida e por todo o cuidado e amor empregues quando o abriram pela primeira vez e com que escreveram os seus capítulos iniciais...as páginas em branco, agora e sempre, anseiam por novo derramar de tinta, almejam tornar escrito que a incerteza que hoje me assola passará a ser a certeza do amanhã! Palavras nunca serão suficientes para me exprimir com a total conviência do meu sentimento. Esta Vitória é Nossa! Obrigado!

À minha Namorada,

Sara Tavares, que tanto admiro e me enche de orgulho e esperança! Tenho tanto a agradecer-te que nem sei por onde começar.... Obrigado por todo o apoio, força, alegria, sorrisos, risos, carinho, amor, partilhas, ..., que todos os dias me dás e proporcionas! Obrigado por não me deixares tornar refém dos meus próprios limites! Obrigado por me provares errado e por teres aberto a Porta da Emoção que, em mim, sempre tendeu a estar trancada pela azáfama e receios oriundos da Muralha da Razão! O meu sorriso sempre foi verdadeiro, mas contigo nunca atingiu tamanha dimensão, até porque contigo, todas as minhas incertezas e inseguranças perdem os seus prefixos...

Aos meus Colegas e Amigos,

em particular ao meu binómio e amigo Daniel Azevedo, que tenho para mim como um verdadeiro irmão e companheiro de aventuras diárias, és indubitavelmente uma pessoa extraordinária e de valores exemplares, uma das pessoas que mais gosto e orgulho tive em conhecer em toda a minha vida e me ajudou imenso no percurso académico, contigo aprendi muito! Não posso deixar de mencionar três pessoas que, embora conheça há menos tempo, têm um lugar cativo e muito especial no meu coração, Mónica, Sara e Helena! Sabem o quanto gosto de vocês e o quão importante foram nestes dois últimos anos do meu percurso académico, não tenho palavras suficientes para vos agradecer todo o carinho, sorrisos e risos e apoio que me deram, sem vocês a concretização final não teria o mesmo sabor! Uma palavra a todos os outros meus colegas, companheiros e guerreiros de faculdade, convosco cresci imenso e tornei-me mais e melhor!

Índice

1	Introdução.....	1
2	Materiais e Métodos	4
3	A Saliva como Ferramenta de Diagnóstico.....	5
4	Patologias Gastrointestinais	8
4.1	Doenças Inflamatórias do Intestino (Doença de Crohn e Colite Ulcerosa).....	8
4.2	Doença Celíaca.....	10
4.3	Cancro Esofágico	13
4.4	Cancro Gástrico.....	15
4.5	Cancro Pancreático.....	18
5	Biomarcadores Salivares.....	20
5.1	Doenças Inflamatórias do Intestino (Doença de Crohn e Colite Ulcerosa).....	21
5.2	Doença Celíaca.....	23
5.3	Cancros Esofágico, Gástrico e Pancreático	24
6	Conclusão.....	32
7	Referências Bibliográficas	33
8	Anexos.....	37

Lista de Abreviaturas

- **RNA** – Ácido Ribonucleico
- **DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- **CD** – Doença de Crohn
- **UC** – Colite Ulcerosa
- **IL-17** – Interleucina 17 (apenas varia número na designação)
- **CARD15/NOD2** – *Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15/Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2*
- **ATG16L1** – Autophagy-Related Protein 16-1
- **TNF- α** - Fator de Necrose Tumoral Alfa
- **GPx** – Glutathione Peroxidase
- **SOD** – Superóxido Dismutase
- **tTG** – *Tissue Transglutaminase*
- **IgA** – Imunoglobulina A
- **IgG** – Imunoglobulina G
- **T CD4+** - Linfócito T Auxiliar (CD4+)
- **miRNA** – Micro-RNA
- **HPV** – Vírus do Papiloma Humano
- **EBV** – Vírus Epstein-Barr
- **EBNA3** – *Epstein-Barr Nuclear Antigen 3*
- **ALDH2** – Aldeído Desidrogenase-2
- **hENT1** – *Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1*
- **lncRNA** – *Long Non-Coding RNA*
- **RNase** – Ribonuclease
- **miR-21** – Micro-RNA 21, *hsa-miR-21* (apenas varia número na designação)
- **PSMA7** – *Proteasome Subunit Alpha Type-7*
- **IL-1 β** - Interleucina 1 Beta
- **CSTB** – Cistatina B
- **TPI1** – Triosefosfato Isomerase
- **DMBT1** – *Deleted in Malignant Brain Tumors 1*
- **CA19-9** – Antígeno Carboidrato 19-9
- **HOTAIR** – *HOX Transcript Antisense RNA*
- **HOTTIP** – *HOXA Distal Transcript Antisense RNA*
- **MALAT1** – *Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*
- **PVT1** – *Plasmacytoma Variant Translocation 1*
- **KRAS** – *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*
- **MDB3L2** – *Methyl-CpG Binding Domain Protein 3-Like 2*
- **ACRV1** – *Acrosomal Vesicle Protein 1*
- **DPM1** – *Dolichyl-Phosphate Mannosyltransferase Subunit 1*

1 Introdução

A cavidade oral tem uma íntima relação com todo o trato gastrointestinal, constituindo a sua porta de entrada e início de comunicação e relação com os fatores exógenos. A saliva é especialmente preponderante e informativa na interação da cavidade oral com o trato gastrointestinal, tratando-se de uma complexa mistura de substâncias segregadas pelas glândulas salivares e de outros produtos provenientes da mucosa da orofaringe, do fluído crevicular, de componentes derivados da corrente sanguínea, das vias aéreas superiores, de restos alimentares, de vestígios de medicamentos e outros compostos químicos e, ainda, do refluxo gastrointestinal(1). Além disso apresenta também na sua composição produtos resultantes do metabolismo da microbiota oral. A saliva é, por isso, amplamente constituída por moléculas proteicas e não proteicas, que são muito importantes para a manutenção da saúde oral, mas que podem funcionar como biomarcadores com considerável potencial de deteção e diagnóstico de várias doenças locais e sistémicas(1-3).

A utilização da saliva como fluído auxiliar de diagnóstico e prognóstico tem atualmente pouca expressão no que se refere à sua projeção para além da cavidade oral(3), apesar de constituir uma técnica de recolha para análise não invasiva, de armazenamento fácil e de baixo custo, quando comparado com as análises sanguíneas. Todavia, o interesse de inúmeros pesquisadores está a aumentar e a adquirir maior significado e relevo científico, por esses mesmos motivos e pela sua rica e mutável composição, consoante estado de saúde geral do paciente(1).

Estudos têm vindo a ser realizados no sentido de provar que constituintes da saliva podem ser usados como marcadores de patologias sistémicas diversas(1), nomeadamente, do trato gastrointestinal e glândulas acessórias, com maior expressão nos cancros esofágico, gástrico e pancreático, doença celíaca e doenças inflamatórias intestinais (colite ulcerosa e doença de Crohn) – tópicos que irão ser explorados nesta dissertação(2, 4).

Partindo-se de um padrão de referência, interpretações qualitativas e quantitativas de marcadores salivares poderão confirmar ou reforçar diagnósticos e contribuir de sobremaneira para a detecção precoce de patologias(2). A recolha de amostras de saliva para análise é segura tanto para profissional de saúde como para o paciente, e a sua utilização e estudo é transversal às diferentes faixas etárias (crianças, adultos e idosos). Adicionalmente, como se trata de um material obtido de forma não invasiva, a recolha em pacientes não cooperantes será bastante mais facilitada do que a recolha de outro tipo de material biológico(1).

Apesar do grande potencial inerente à saliva humana, será essencial fazer uma análise concisa e objetiva da cavidade oral dos pacientes, pois diversos fatores indissociáveis desta poderão influenciar nefastamente os diagnósticos(1), tais como inflamações/infeções locais que, inevitavelmente, conduzem ao aparecimento de citocinas pró-inflamatórias na sua composição, por exemplo. Por esta razão, marcadores mais específicos de determinadas patologias sistémicas, assim como combinações entre eles, serão necessários para diagnósticos diferenciais e minimizar o máximo possível a indução ao erro(4).

As doenças do foro gastrointestinal afetam de uma forma marcada e generalizada as populações a nível mundial, pelo que a introdução e valorização da saliva como método adicional ou primário não invasivo de diagnóstico será de importante utilidade e interesse no âmbito da Ciência e Medicina.

Vários estudos têm comprovado e salientado a importância de biomarcadores salivares na detecção (precoce) e diagnóstico auxiliar de patologias do trato gastrointestinal, nomeadamente: a enzima triosefosfato isomerase e a proteína cistatina B, no cancro gástrico(5); micro-RNA's na detecção precoce do cancro pancreático e do cancro esofágico(6, 7); micro-RNA's que permitem fazer a distinção entre doença de Crohn e colite ulcerosa(8); assim como, a monitorização terapêutica dos anticorpos Anti-Transglutaminase típicos da doença celíaca(9).

Estes são alguns exemplos dos resultados que serão expostos e explorados neste artigo de Revisão Bibliográfica, com o intuito de reforçar a plausibilidade da saliva como meio de diagnóstico auxiliar de doenças do trato gastrointestinal.

2 Materiais e Métodos

A pesquisa bibliográfica foi realizada através da base de dados online *Pubmed*, com recurso às palavras-chave “gastrointestinal diseases and saliva biomarkers”, “pancreatic cancer and saliva”, “gastric cancer and saliva”, “esophageal cancer and saliva”, “inflammatory bowel disease and saliva”, “celiac disease and saliva”, “salivary biomarkers”, “gastrointestinal cancer”, “inflammatory bowel disease” e “celiac disease”. A pesquisa foi restringida, numa primeira instância, a artigos científicos publicados nos últimos 10 anos, tendo como critérios de inclusão para validação dos mesmos uma correlação direta entre biomarcadores salivares e patologias gerais do trato gastrointestinal. Numa fase posterior, direcionou-se a pesquisa especificamente para os cancros gástrico, pancreático e esofágico, doenças inflamatórias do intestino e doença celíaca, assim como para os biomarcadores característicos de cada uma das patologias anteriormente citadas. Toda a pesquisa efetuada ao longo da presente monografia obedeceu aos seguintes filtros: disponibilidade do texto completo dos artigos e resultados obtidos em humanos. Também outras fontes de informação de interesse no âmbito deste artigo foram consultadas, nomeadamente alguns livros científicos e trabalhos académicos de conteúdo considerado relevante.

3 A Saliva como Ferramenta de Diagnóstico

A saliva trata-se de um fluido corporal de extrema relevância e preponderância, de composição rica e variada, contendo: proteínas/polipéptidos, como enzimas digestivas, inibidores de proteases, proteínas antimicrobianas para proteção imunológica; moléculas inorgânicas, como água e sais minerais; outras moléculas orgânicas, tais como ácido úrico, glicose e aminos; hormonas, esteróides e não esteróides; moléculas lipídicas, como colesterol e ácidos gordos(3, 8). Fatores antimicrobianos e anticorpos foram também reconhecidos como componentes orgânicos existentes na saliva(10). O conteúdo salivar torna-se ainda mais complexo e completo tendo em conta a confluência das substâncias segregadas pelas vias aéreas superiores, mucosa da orofaringe, refluxo gastrointestinal, fluido crevicular, corrente sanguínea e até aqueles provenientes dos próprios resíduos alimentares e da microbiota oral(2).

As glândulas salivares iniciam a produção de saliva como resposta a diferentes estímulos, maioritariamente influenciados por fatores como a hora do dia, os alimentos ingeridos, a idade e sexo do indivíduo, por exemplo(1, 3). As glândulas major são as principais responsáveis pela secreção salivar – parótida realiza cerca de 20% da produção, submandibulares 60-70% e sublinguais 7-8%-, sendo que a saliva produzida em cada uma delas difere entre si em termos de composição e propriedades. As glândulas minor apresentam uma expressão residual do ponto de vista quantitativo da produção salivar(3).

Um fluxo sanguíneo considerável atinge as glândulas salivares, pelo que, em última instância, a saliva representa um prolongamento e a fase terminal do conteúdo da circulação sanguínea(11). Deste modo, diversos componentes do sangue são também encontrados na composição salivar, nomeadamente, proteínas, fármacos e drogas, vírus, RNA e DNA(12). Torna-se plausível e necessário afirmar que a saliva, enquanto parte constituinte indissociável e primordial da cavidade oral, estabelece uma ponte de comunicação entre a cavidade oral e o trato gastrointestinal, assim como outros órgãos e tecidos(13).

É possível estabelecer um elo de ligação e comparação entre o sangue periférico e a saliva, no que concerne a diferentes estados fisiológicos e patológicos do organismo, ou seja, alterações da saúde, como inflamações e infecções e, até, neoplasias, traduzem-se em variações da composição da corrente sanguínea, sendo que, de igual forma, a composição da saliva pode ser modificada em decorrência dessas mesmas condições. Será, então, legítimo inferir, com as devidas prudências e ressalvas, que a saliva é um fluido de diagnóstico do estado de saúde preciso, não invasivo, inócuo e de recolha e análise mais célere, quando comparado com as análises sanguíneas(8). Investigações têm vindo a ser desenvolvidas com o intuito de desnudar a diversidade proteica presente na saliva, provando a sua eficiência e plausibilidade para diagnóstico de múltiplas enfermidades. Nesse sentido, *Amado et al*, por exemplo, estudaram os proteomas da saliva e conseguiram isolar e descrever um total superior a 2300 proteínas(3).

A saliva desempenha funções inequívocas e preponderantes, nomeadamente: de proteção (das mucosas contra agentes estranhos; por via de atividades antifúngicas, antimicrobianas e antivíricas), digestão (através de atividade enzimática), lubrificação e deglutição, limpeza e manutenção da integridade dos tecidos dentários (por via da regulação dos equilíbrios iónicos e da remineralização do esmalte e dentina, atenua difusão de ácidos) e, ainda, auxilia na gustação (paladar)(2, 3, 14). A saliva tem vindo a ser reconhecida como importante meio auxiliar de diagnóstico, tendo o seu uso aumentado nas últimas duas décadas(10).

No entanto, o potencial da saliva enquanto meio de diagnóstico apenas será devida e corretamente explorado e aplicado quando estiverem definidas inequivocamente as metodologias a utilizar e estabelecidos os padrões de referência da composição salivar, entre o que é considerado normal (fisiológico) e não normal (patológico). Uma vez implementados os padrões de referência, a composição salivar poderá ser avaliada quantitativa e qualitativamente por motivos de diagnóstico e, até, servir como indicativo de tratamentos a realizar(2).

Inúmeros estudos demonstraram já que componentes da saliva, como metabolitos e proteínas, podem ser usados para avaliar e detetar patologias locais e sistémicas diversas. Sendo disso exemplo o cancro oral, cancro da mama, cancro do pulmão, cancro dos ovários, síndrome de Sjogren, patologias inflamatórias e neoplásicas gastrointestinais, entre outras (orais e sistémicas)(12).

4 Patologias Gastrointestinais

4.1 Doenças Inflamatórias do Intestino (Doença de Crohn e Colite Ulcerosa)

Respostas imunológicas exacerbadas e inapropriadas são características inerentes de inúmeras desordens autoimunes, onde se incluem as doenças inflamatórias do intestino, nomeadamente, a doença de Crohn (CD)(15) e a colite ulcerosa (UC) – as duas doenças inflamatórias (crônicas) intestinais primárias e mais prevalentes(8, 13, 16). A complexa etiologia de ambas envolve tanto fatores ambientais como genéticos, influenciando sinergicamente a patogénese das doenças inflamatórias do intestino, de origem idiopática(8, 13, 15, 17). Ocorre, então, uma resposta imunológica excessiva ao longo do trato gastrointestinal (na DC pode mesmo estender-se desde cavidade oral até ânus), fazendo-se a distinção entre as duas doenças avaliando a natureza e localização das alterações inflamatórias(8).

A causa exata das doenças inflamatórias do intestino não é, ainda hoje, totalmente conhecida e compreendida, embora seja evidente a intervenção de alguns fatores na sua patogénese, como: predisposição genética e epigenética, o próprio sistema imunológico do hospedeiro, a composição da microbiota intestinal e, ainda, lesões e exposições a fatores exógenos/ambientais(8, 15, 18). Toda esta conjugação leva a distúrbios da homeostasia intestinal, culminando numa resposta imunológica desregulada(15, 16). Por vezes, para haver melhoria de sintomatologia nos pacientes a terapia com antibióticos, prebióticos e probióticos pode ser eficaz, atenuando algumas das manifestações das doenças inflamatórias crônicas(18).

Atualmente, estão já identificados mais de 100 *loci* cromossómicos com associação positiva e significativa com as doenças inflamatórias do intestino. Vários estudos correlacionaram citocinas (como IL-17), recetores de citocinas (como recetor IL-23) e elementos de resposta bacteriana (nomeadamente, CARD15/NOD2, ATG16L1)(8, 18, 19) com desenvolvimento das doenças

inflamatórias do intestino, na decorrência de mutações ou alterações nestas referidas vias(8).

A doença de Crohn constitui uma inflamação crônica granulomatosa que pode afetar todo o trato gastrointestinal(15, 17, 18, 20), porém a sua localização mais frequente é no íleo terminal e cólon proximal(15). A CD faz-se manifestar por períodos de exacerbação e de remissão, tendo como sintomas mais comuns dor abdominal, febre e perda de peso(20). Ao longo do decurso da doença, é provável que metade das pessoas afetadas vá sofrer de sintomatologia mais dolorosa e complicada, sendo disso exemplo a formação de fístulas, abscessos intra-abdominais e estreitamentos intestinais(15). A sua etiopatogénese permanece desconhecida, no entanto, sabe-se que diferentes citocinas estão envolvidas, com destaque para TNF- α , encontrando-se em níveis séricos elevados em mais de 50% dos doentes(15, 21).

Na CD a hiper-reactividade do sistema imunológico poderá estar intimamente relacionada com a presença de stress oxidativo e maior libertação de espécies reativas de oxigénio(20, 22). Deste modo, o stress oxidativo tem vindo a ser proposto como um dos fatores que mais contribui para a degradação do trato gastrointestinal, estando associado a algumas das características indissociáveis da CD(15, 22), como a inflamação e complicações transmuralis do trato gastrointestinal(15). Ao chegar-se a um melhor entendimento da patofisiologia da CD e da sua relação com o stress oxidativo abrem-se portas promissoras para outras modalidades de tratamento da doença, como maior defesa celular com antioxidantes(22).

Vários autores têm vindo a demonstrar que os pacientes com doença de Crohn apresentam concentrações inferiores de enzimas antioxidantes nos tecidos intestinais, mas os seus níveis plasmáticos dependem da atividade da doença(15, 20). As principais enzimas antioxidantes intracelulares que participam ativamente na proteção celular contra os efeitos do stress oxidativo são a glutatona peroxidase (GPx) e o superóxido dismutase (SOD)(15, 22).

Na doença de Crohn podem surgir lesões orais características(16), sendo mais prevalentes nas crianças (48-80%) do que nos adultos (0,5-20%) – como

lesões polipoides com aspeto de “pedra da calçada” e gengivite(13). Lesões não específicas, como estomatite aftosa, ulcerações várias e glossite atrófica foram já também observadas em pacientes com CD (4-37%)(13, 20).

A colite ulcerosa afeta a mucosa que reveste internamente o intestino grosso ou cólon, ficando inflamada e com pequenas feridas na superfície que podem sangrar. A UC pode afetar uma extensão variável de intestino grosso, desde apenas alguns centímetros do recto, até à totalidade do cólon. Esta doença pode ter um impacto considerável na vida dos doentes, causando sintomas recorrentes de diarreia sanguinolenta, urgência rectal e sensação dolorosa causada por contractura do esfíncter anal(23).

4.2 Doença Celíaca

A doença celíaca é uma patologia crónica autoimune, mediada por células T que afeta o intestino delgado, sendo despoletada por uma resposta imunológica secundária à ingestão de glúten (mistura heterogénea de proteínas ricas em glutamina e prolina), em indivíduos geneticamente predispostos e suscetíveis(24, 25). Caracteriza-se pelo aparecimento de uma combinação de manifestações clínicas dependentes de glúten, por apresentar uma serologia esclarecedora com presença de auto-anticorpos específicos (como anti-transglutaminase (tTG) IgA e/ou IgG, anti-endomísio (EMA) IgA e anti-gliadina (AGA) IgA e/ou IgG - presentes em crianças com menos de 4 anos, que ainda não produzem os anticorpos tTG), pela existência dos haplotipos HLA-DQ2 (presente em cerca de 90 a 95% dos doentes)(26, 27) e HLA-DQ8 e, ainda, enteropatias várias. A forma menos falível e de confirmação de diagnóstico da doença é a realização de uma biópsia intestinal, que deverá ser efetuada após testes serológicos que confirmem a presença do anticorpo tTG IgA(25, 26).

A ingestão de gliadina (proteína monomérica constituinte do glúten e responsável pela sua extensibilidade) e de prolaminas (proteínas presentes em cereais, como trigo, cevada e centeio), que possuem na sua constituição

resíduos de glutamina e prolina, desencadeia a manifestação da doença celíaca, uma vez que estas proteínas são resistentes à digestão total, criando-se assim péptidos imunogénicos potencialmente tóxicos(25, 28). Estes péptidos contêm glutamina na sua composição, que é suscetível à desaminação pela transglutaminase tecidual. Este processo torna os péptidos passíveis de serem reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos DQ2+ e DQ8+(10, 25). Por conseguinte, estas últimas apresentam os péptidos derivados do glúten às células T CD4+, que ativam a resposta tipo-1 das células T auxiliares, com produção de interferão gama e IL-2, que estimulam linfócitos T citotóxicos e macrófagos, desenvolvendo-se a doença celíaca propriamente dita - infiltração de células inflamatórias nas zonas intraepiteliais e da lâmina própria da mucosa intestinal, hiperplasia das criptas intestinais e atrofia das vilosidades, conduzindo inevitavelmente a uma má absorção intestinal, com consequentes deficiências e carências a nível nutricional(10, 24, 25, 27). A doença celíaca será uma patologia permanente e multifatorial, com forte componente genético associado(10).

Inicialmente pensava-se que a doença celíaca era uma enfermidade de prevalência e incidência típicas dos países europeus, contudo estudos recentes vieram revelar uma distribuição global da mesma, afetando cerca de 0,6 a 1% da população mundial(25).

A doença celíaca surge predominantemente em idades precoces da infância, habitualmente entre os segundo e terceiro semestres de vida da criança, alguns meses após introdução de farinha com glúten e seus derivados na alimentação(25). Os sintomas típicos passam por diarreia crónica, vômitos, distensão abdominal, atrasos de crescimento e desenvolvimento e alterações humorais(29). Todavia, sintomas atípicos podem também manifestar-se, tais como: hipertransaminasemia, anemia por deficiência de ferro, úlceras na cavidade oral e defeitos no esmalte dentário. A doença celíaca pode ainda precipitar outras comorbidades que vão para além do foro intestinal, tais como: neuropatia periférica, osteoporose e, até, infertilidade ou baixa fertilidade(29-31).

A doença celíaca é uma patologia crônica, acompanhará toda a vida do seu portador, estando associada a significativa morbidade e mortalidade caso o seu tratamento seja subvalorizado e descuidado(32). Se não diagnosticada e tratada, haverá um risco de desenvolvimento de complicações de longo-termo, como doenças autoimunes e neoplasias malignas no trato gastrointestinal (linfoma intestinal ou cancro esofágico, por exemplo)(29, 32).

Uma vez diagnosticada, a terapêutica da doença celíaca passará pelo estabelecimento de uma dieta rígida durante toda a vida do indivíduo, dieta livre de glúten, com o intuito de reduzir e eliminar os sintomas e sinais e restabelecer a normal fisiologia intestinal(25, 32-34). No entanto, a exclusão total de glúten da alimentação poder-se-á revelar um cenário quase utópico, porque se trata de uma proteína com grande expressão e representação na dieta ocidental e, também, devido, em parte, à contaminação cruzada entre os diferentes alimentos(28, 35).

A doença celíaca surge, geralmente, como supracitado, em crianças, após a apresentação das mesmas a uma alimentação rica em glúten, todavia, são cada vez mais frequentes os casos detetados apenas em idades mais tardias, na adolescência e mesmo em adultos(25, 26). Estes dados sugerem que os fatores ambientais podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da doença celíaca. Nesse sentido, grupos de investigação têm vindo a demonstrar que em indivíduos predispostos a desenvolver a doença pode existir uma influência significativa das microbiotas oral e intestinal(25).

Por vezes, a doença celíaca poderá evoluir para a sua forma refratária, que se caracteriza pela persistência de alguma sintomatologia (como danos nas vilosidades do intestino delgado não reparados) mesmo após adoção de dieta livre de glúten, aumento de presença intraepitelial dos linfócitos T e quadro grave de má absorção intestinal(24, 36), assim como, parecem ocorrer alterações dos microbiomas oral e gastrointestinal que contribuem para essa persistência de inflamação(24).

A terapêutica ideal para tratamento desta patologia seria alcançar uma digestão mais completa do glúten e especificamente da sua ação imunogénica nos doentes. Nesse sentido, existem já estudos clínicos de fase I-II que estão a explorar a potencial ação de endopeptidases derivadas de bactérias e fungos(28).

4.3 Cancro Esofágico

O cancro esofágico é considerado o oitavo mais recorrente e a sexta causa de morte por cancro, a nível global(7, 37). É 3 a 4 vezes mais prevalente no sexo masculino. A taxa de sobrevivência geral é considerada baixa, com apenas 3-5% dos doentes diagnosticados a sobreviverem ao fim de 5 anos(38). Depreende-se, então, que o diagnóstico e tratamento precoces são de extrema e vital importância para o paciente(7, 37, 39, 40).

Atualmente, o diagnóstico do cancro esofágico está maioritariamente dependente de exames radiológicos e biópsia endoscópica. No entanto, a execução destes exames acarreta custos elevados. Adicionalmente, sendo métodos invasivos causam desconforto nos pacientes e a maioria destes encontram-se já num estado avançado da doença quando o diagnóstico definitivo é obtido(39, 41). Por estas razões, torna-se crucial e preponderante identificar biomarcadores que sejam característicos e típicos nas fases precoces do desenvolvimento do cancro esofágico(7, 37, 39, 40).

Várias investigações científicas têm vindo a demonstrar uma relação próxima entre a expressão aberrante de miRNA's e a génese e desenvolvimento de cancro, ou seja, alguns miRNA's poderão ser usados como importantes biomarcadores neoplásicos(37). O cancro esofágico não é exceção a este facto, podendo-se encontrar expressão aberrante de miRNA's no plasma sanguíneo e nos tecidos neoplásicos destes doentes(7).

O cancro esofágico pode ser dividido em dois subtipos principais, conforme as suas características patológicas, sendo eles: o adenocarcinoma e o carcinoma de células escamosas, que entre si representam mais de 90% dos casos de cancro esofágico, em todo o mundo(37, 39). A deteção precoce do carcinoma de células escamosas é de indubitável importância para reduzir a mortalidade a si associada, porém, vários autores relataram a dificuldade do seu diagnóstico em fases iniciais, pois esta variante do cancro esofágico faz-se manifestar por lesões assintomáticas nos primeiros estados de evolução(39). O carcinoma de células escamosas do esófago é um subtipo particularmente problemático do cancro esofágico, em resultado da natureza multifatorial do seu desenvolvimento e a influência que hábitos nefastos (como fumar, alcoolismo, ingerir bebidas e alimentos demasiado quentes e, até, pobre consumo de vegetais ou frutas) podem ter no aumento do risco de ocorrência do carcinoma(37, 39, 40, 42). Nestes casos, os riscos acrescidos poderão estar associados a um contacto direto dos potenciais carcinogénicos com o epitélio esofágico, por intermédio de mecanismos que podem envolver o transporte facilitado entre células ou compostos que aumentam as taxas de renovação das células do epitélio, conduzindo a desregulação celular(39). Existe, ainda, um tópico controverso que tenta correlacionar a infeção pelo vírus HPV com o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas do esófago, precisando, no entanto, da realização de mais estudos que permitam inferir uma associação clara entre ambos(39, 43).

Outras investigações científicas têm também vindo a relacionar uma má higiene e saúde orais com um risco aumentado de ocorrência do carcinoma de células escamosas do esófago(42). Uma saúde oral precária poderá constituir um fator de risco para o desenvolvimento da lesão precursora do carcinoma, a displasia das células escamosas, atuando de forma sinérgica com outros fatores de risco(42, 44). Todavia, o mecanismo subjacente a tal predisposição e associação não é ainda completamente compreendido. Apesar de não existirem muitos estudos neste tópico, será legítimo assumir que o microbioma oral pode ser relevante na deteção de cancro e outras doenças crónicas,

através do metabolismo dos carcinogénicos (nitrito e etanol, por exemplo) por via de efeitos inflamatórios sistémicos(42).

Atualmente, as técnicas mais utilizadas para diagnóstico do cancro esofágico são exames radiológicos não invasivos, tais como a tomografia computadorizada e endoscopia com ultrassons(7, 39). Uma característica molecular que pudesse ser associada ao desenvolvimento do cancro esofágico poderia constituir um indicador lícito e plausível para o seu diagnóstico precoce e conseqüente tratamento(39).

4.4 Cancro Gástrico

O cancro gástrico é segunda causa de morte relacionado com o cancro, em todo o mundo, sendo o quarto tipo de neoplasia maligna mais comum(45-48). Para a etiologia da neoplasia maligna do estômago contribuem fatores ambientais e de estilo de vida, nomeadamente, hábitos tabágicos, infeção pela *Helicobacter pylori* (estudos epidemiológicos sugerem que o risco de desenvolvimento de cancro gástrico ascende aos 75%, ao ser responsável por provocar lesões pré-malignas como gastrites crónica a atrófica, úlceras duodenais e danos nos tecidos linfoides gástricos)(48, 49), consumo excessivo de sal e alimentos processados, abuso de álcool, défices de ingestão de vitamina C e de vegetais e idade avançada, entre outros(45, 46). Estes fatores de risco enumerados parecem explicar apenas 60% da incidência do cancro gástrico. A maioria dos carcinomas gástricos está associada a infeção pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV) e à colonização pela bactéria *Helicobacter pylori*(46). Os casos de cancro gástrico decorrentes da infeção pelo EBV correspondem a cerca de 10% do total. O EBV trata-se de um vírus ubíquo com uma taxa de infeção, a nível global, a rondar os 90% da população adulta, estando também associado a várias doenças linfoproliferativas(50). Existem estirpes do vírus *Epstein-Barr* que estão mais relacionados com o desenvolvimento do cancro gástrico, acarretando riscos superiores de ocorrência deste. Os genes BRFL1,

BBRF3 e BBLF2/BBLF3 do EBV têm sido associados com maior veemência ao carcinoma gástrico, sendo que o desenvolvimento deste poderá dever-se, em parte, ao importante papel do gene oncogénico EBNA3(50, 51).

O mais recorrente dos subtipos do cancro gástrico, o adenocarcinoma (cerca de 90%)(48), tem uma sequência pré-neoplásica bem definida, iniciando-se com uma gastrite crónica superficial que progride para uma gastrite atrófica, metaplasia intestinal e, em última instância, evolui para displasia e adenocarcinoma(46).

Vários estudos epidemiológicos têm vindo a associar uma precária higiene e saúde orais com um risco aumentado de ocorrência de cancro gástrico(46). Deste modo, hipóteses que incluem a doença periodontal como potenciadora do risco deste tipo de cancro têm vindo a ganhar mais relevância. Infecções bacterianas da cavidade oral podem estar correlacionadas com o desenvolvimento de cancro gástrico, ao induzirem inflamação crónica sistémica ou gástrica – assim como a colonização pela *Helicobacter pylori* (49) pode despoletar inflamação crónica local e, em estados mais avançados, provocar adenocarcinoma gástrico(46).

O consumo de bebidas alcoólicas está intimamente relacionado com a produção de acetaldeído – composto carcinogénico, mutagénico, genotóxico, e citotóxico, cujo comportamento químico se deve ao seu grupo aldeído extremamente reativo e que facilmente se liga a componentes tecidulares e DNA(45). Este produto da metabolização do etanol está associado ao desenvolvimento de cancros gástrico e esofágico, por exemplo. Este risco é exponencialmente maior em indivíduos que possuem uma mutação pontual no gene de codifica a enzima ALDH2, com importante papel no metabolismo do álcool no nosso organismo, atuando como catalisadora no processo de oxidação do acetaldeído – esta carência genética da enzima resulta numa exposição significativamente mais prolongada da mucosa gástrica ao acetaldeído, após ingestão de álcool(45, 52). Indivíduos que possuem a mutação no gene ALDH2 e ingerem álcool apresentam concentrações elevadas de acetaldeído na saliva e suco gástrico, constituindo assim um grupo

de risco ao desenvolvimento de cancros gástrico e trato digestivo superior, em resultado do maior tempo de contacto e exposição da mucosa ao acetaldeído(45, 52).

Os indivíduos com gastrite atrófica e mutação pontual no gene ALDH2 constituem o grupo de maior risco de ocorrência de cancro gástrico, quando a esses fatores se associa consumo exacerbado de álcool(45, 53). Esta predisposição explica-se pelo défice de produção de ácido hidrocloreídrico pela mucosa gástrica atrófica, que vai permitir a colonização de bactérias típicas da cavidade oral no estômago. Esta situação conduz, por conseguinte, a um aumento de produção local de acetaldeído a partir do etanol, após consumo de álcool. Para atenuar e controlar este processo poder-se-á administrar L-cisteína, aminoácido essencial, que é capaz de se ligar ao acetaldeído, por ligação covalente, diminuindo a sua reatividade e promovendo a sua eliminação(45).

Para se ter uma melhor noção e compreensão da gravidade do cancro gástrico, será prudente salientar que a taxa de sobrevivência em 6 meses, em indivíduos diagnosticados nos estados mais avançados da doença, é inferior a 15%, enquanto a taxa de sobrevivência ao fim de 5 anos se situa entre os 5-10%, tornando a prevenção de problemas do foro oncológico no estômago bastante importante(45, 47, 48). O problema da mortalidade associada ao cancro gástrico passa precisamente por este último ponto, o atraso de diagnóstico, uma vez que as fases iniciais de evolução são geralmente assintomáticas ou com sintomatologia inespecífica(48). Atualmente, o diagnóstico do carcinoma do estômago tem como *gold-standard* a endoscopia com biópsia, já quando os sintomas são mais exuberantes, como disfagia, perda de peso, massa abdominal palpável, devido ao estado mais avançado da patologia e até metastização desta – o seu longo período de latência é uma das suas grandes problemáticas(47, 48). O interesse em métodos de diagnóstico não invasivos e de fácil acesso e colheita adquire crescente importância no seio da comunidade médica e científica, pois a deteção precoce do cancro gástrico é crucial para assegurar um melhor prognóstico – importância dos biomarcadores salivares(47, 48).

4.5 Cancro Pancreático

O cancro pancreático é um dos cancros mais frequentemente fatais, em todo o mundo, com a pior taxa de sobrevivência entre todos os tipos de cancro que podem atingir o ser humano(6, 11, 54, 55). Tal facto deve-se ao seu desenvolvimento “silencioso” e assintomático, à sua evolução célere e agressiva, à sua resistência aos agentes terapêuticos convencionais e específicos e à inexistência de métodos de análise e monitorização efetivos e eficientes, que fazem com que o cancro pancreático tenha um muito mau prognóstico(11, 56), com uma taxa de sobrevivência até 5 anos de apenas 5%(57). Atualmente, o único tratamento eficaz consiste na resseção cirúrgica. Perto de 15-20% dos indivíduos diagnosticados com cancro pancreático constituem casos passíveis de resseção cirúrgica à data do diagnóstico, porém apenas 20% desses sobrevivem ao fim de 5 anos(6, 12, 54, 57). Entende-se, então, que o diagnóstico e cirurgia precoces assumem uma preponderância vital para os doentes(12, 55).

Poucos fatores de risco estão atualmente associados ao desenvolvimento de cancro pancreático, reunindo, no entanto, consenso no que concerne aos fumadores de tabaco. Todavia, estudos vieram já correlacionar risco de ocorrência de cancro pancreático com diabetes, obesidade e resistência à insulina. Além disso, a inflamação recorrente da pancreatite crónica é, por si só, um fator predisponente ao desenvolvimento da neoplasia maligna, uma vez que a inflamação está envolvida com potenciação da proliferação celular e mutagénese, reduzindo a adaptação ao stress oxidativo, promovendo a angiogénese, inibindo a apoptose e, claro, aumentando a produção de mediadores inflamatórios(57).

O principal entrave para a deteção precoce do cancro pancreático prende-se com a inexistência de métodos que possam identificar com segurança indivíduos potencialmente afetados (54). As estratégias atuais de diagnóstico precoce, ou tentativa deste, são algo falíveis por duas ordens de razão: primeiro, estão restritas a grupos de indivíduos com grande risco de ocorrência pré-determinados; em segundo lugar, os procedimentos são, por norma,

invasivos ou podem ser deficitários no que diz respeito à sensibilidade e especificidade(55). A aposta na descoberta de marcadores biológicos que possam determinar, por si só, fortes indícios de suspeita de cancro pancreático é condicionada pela existência de várias doenças benignas pancreáticas (como a pancreatite crónica), que apresentam uma sobreposição fenotípica com os estados iniciais do cancro pancreático(55, 57). Este facto precisa de ser contornado para que se possam apostar em biomarcadores com alta especificidade para o cancro pancreático, na fase mais precoce possível(11, 55).

Foram já estudados e identificados miRNA's salivares e microbiota que têm o potencial de discriminar o cancro pancreático passível de ser removido cirurgicamente. Inúmeros miRNA's foram descritos como tendo expressão aberrante em tecidos de cancro pancreático e plasma, sendo responsáveis por regular as diversas funções celulares, como a migração e invasão(56). De igual forma, miRNA's salivares têm o potencial de possuir capacidade discriminatória de identificação do cancro pancreático(6, 12). Alguns estudos chegaram já ao consenso de moléculas específicas e típicas expressas no cancro pancreático, sendo disso exemplo proteína de ligação ao cálcio S100P, sendo que algumas destas moléculas melhoram a sensibilidade do diagnóstico quando combinadas com citologia ou biópsia(56, 58).

A realidade é que a maioria dos pacientes com cancro pancreático apresentam-se já numa fase inoperável da doença, em resultado do estabelecimento de metástases à distância ou de tumor local em estado muito avançado, levando a uma estimativa média de sobrevivência entre 4 a 6 meses(6, 56). Esta situação vem salientar a importância de controlo da neoplasia através de quimioterapia ou quimiorradioterapia. Indivíduos que apresentem cancro pancreático não passível de resseção cirúrgica estão indicados para quimioterapia com gemcitabina (análogo de nucleosídeo), dado que as células pancreáticas cancerígenas expressam em apreciável quantidade a proteína hENT1 que tem grande afinidade com a gemcitabina(56).

5 Biomarcadores Salivares

Os biomarcadores, ou marcadores biológicos, podem ser definidos como características específicas que podem ser objetivamente quantificadas, qualificadas e avaliadas no que diz respeito aos normais fenômenos fisiológicos, processos patológicos e até a respostas farmacológicas diversas em resultado de administrações terapêuticas(39). Os biomarcadores têm, então, um elevado potencial no auxílio ao diagnóstico de inúmeras patologias(7, 37, 39). Nesse sentido, existem três áreas da biotecnologia que investigam e estudam esses mesmos marcadores, permitindo efetuar análises em larga escala para detecção de diferentes moléculas(39), sendo elas: a Transcriptômica, que estuda e permite a análise do transcriptoma, conjunto de transcritos (RNA's mensageiros, RNA's ribossômicos, RNA's transportadores e microRNA's) de uma célula ou conjunto de células(39, 55); a Proteômica, que estuda o proteoma, conjunto de proteínas e suas variantes, de uma célula ou conjunto de células(47, 48); e a Metabolômica, que se dedica ao estudo do metaboloma, conjunto de metabolitos produzidos e/ou modificados por um organismo(55). As alterações patofisiológicas que acompanham o desenvolvimento de uma doença levam a modificações nos normais perfis de transcritos, proteínas e metabolitos, que podem ser detetadas, analisadas e quantificadas no âmbito das tecnologias supracitadas(39), sendo os fluídos humanos (como a saliva) potenciais fontes de biomarcadores para esses estudos.

Os miRNA's (família de RNA's não codificantes de comprimento curto, com 18 a 24 nucleótidos) têm potencial para se tornarem ótimos biomarcadores (salivares), graças à sua forma estável, estando envolvidos na diferenciação, ciclo e apoptose celulares(59-62). Os miRNA's participam nos processos celulares ao terem como alvos centenas de mRNA's, podendo regular a expressão de oncogenes ou genes supressores tumorais no cancro, promovendo ou inibindo o início e evolução do mesmo(62, 63). Enquadram-se em duas categorias: os celulares e os extracelulares.(7) Os miRNA's extracelulares são os que assumem principal importância como potenciais

biomarcadores, podendo ser encontrados na saliva e outros fluídos corporais, funcionando como sinalizadores intercelulares(7, 37). Apesar da presença da enzima RNase, a saliva e outros fluídos corporais parecem ter a capacidade de possuir miRNA's de forma estável e com resistência à degradação por ação da temperatura (baixa ou alta), meios muito ácidos e alcalinos e até por ação da própria RNase. Este facto deverá ser devido à proteção conferida por um complexo de outras moléculas que envolvem e protegem os miRNA's, sendo disso exemplo, exossomas, proteínas e lípidos(7, 37, 59, 60, 62, 64).

Os exossomas, vesículas esféricas com um diâmetro compreendido entre 40-120 nm, podem também ser biomarcadores com grande potencial discriminatório, existindo em quase todos os fluídos corporais, onde se inclui a saliva. Os exossomas têm uma composição e conteúdo diversificados (incluindo proteínas, lípidos e RNA's) e têm vindo a ser considerados como importantes na comunicação de material entre células, devido à sua capacidade de transportar substâncias(13, 62).

5.1 Doenças Inflamatórias do Intestino (Doença de Crohn e Colite Ulcerosa)

Schaefer J, *et al*(8) realizaram um estudo onde avaliaram a diferença existente entre a expressão de miRNA's salivares em indivíduos com doenças inflamatórias intestinais *versus* indivíduos saudáveis, com o intuito de identificar marcadores biológicos característicos da doença de Crohn e da colite ulcerosa. Após análise de expressão usando *microarray*, os autores detetaram 5 miRNA's (miR-21, miR-31, miR-101, miR-142-3p e miR-142-5p) com expressão alterada, estatisticamente significativa, na saliva dos pacientes com doenças inflamatórias, em comparação com o grupo saudável. Schaefer J, *et al*(8) constataam que miR-101 se encontrava em maior quantidade na saliva de pacientes com CD, enquanto miR-21, miR-31 e miR-142-3p estavam significativamente mais elevadas na saliva de doentes com UC. Por outro lado, miR-142-5p encontrava-se muito menos presente nos pacientes com UC.

Schaefer J, *et al*(8) concluíram que existem miRNA's com padrões de expressão específicos na doença de Crohn e na colite ulcerosa.

Zheng X, *et al*(13) fizeram um estudo onde investigaram o conteúdo dos exossomas salivares em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (CD e UC), comparando-os com um grupo de controlo (saudável), com o propósito de explorar e identificar um novo biomarcador nesses doentes. Os autores constataram que o proteossoma PSMA7 se encontrava especialmente expresso nos indivíduos com doenças inflamatórias do intestino. Foi concluído que o PSMA7 presente nos exossomas salivares existia em grandes concentrações nos pacientes com CD e/ou UC, pelo que pode ter um grande potencial para ser usado como marcador biológico indicador de doenças inflamatórias intestinais. Para além disso, o PSMA7 pode ainda ser promissor na monitorização do desenvolvimento da doença.

Szczeklik K, *et al*(20) desenvolveram um estudo para averiguar a prevalência de lesões na cavidade oral em pacientes adultos com doença de Crohn e simultaneamente investigaram a associação entre as concentrações salivares de IL-1 β (interleucina 1 β), IL-6 (interleucina 6) e TNF- α com as manifestações orais e atividade da CD. Szczeklik K, *et al*(20) chegaram à conclusão que, em pacientes com doença de Crohn ativa, os níveis salivares de IL-1 β , IL-6 e TNF- α são superiores àqueles encontrados na saliva de indivíduos saudáveis e mesmo à de pacientes com CD inativa, o que sugere que estão envolvidos na inflamação gastrointestinal – potencial uso de citocinas salivares como biomarcadores sensíveis para atividade da doença de Crohn. Said H, *et al*(16) constataram também que os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α eram mais elevados nos pacientes com CD.

Said H, *et al*(16) realizaram uma investigação onde concluíram que existe uma diferença entre a composição da microbiota oral de pacientes com doenças inflamatórias intestinais e indivíduos saudáveis, existindo abundância relativa do género bacteriano *Prevotella* na saliva dos doentes e do género *Streptococcus* nos indivíduos saudáveis. Said H, *et al*(16) detetaram ainda níveis superiores de citocinas e IgA salivares e níveis inferiores de lisozimas

salivares nos pacientes com CD e UC. Os autores concluíram que a disbiose da microbiota oral pode estar relacionada com as respostas inflamatórias nos pacientes com doenças inflamatórias do intestino, sugerindo que estará de algum modo associada à disbiose intestinal.

5.2 Doença Celíaca

Pacientes com doença celíaca apresentam uma microbiota salivar e, especialmente, um metaboloma distintos quando comparados com indivíduos saudáveis(24), apresentando uma pobre diversidade bacteriana e níveis inferiores de compostos orgânicos voláteis. Contudo, desconhece-se a relação exata existente entre doença celíaca e microbiota oral, isto é, qual o impacto desta em doentes celíacos, ou se será apenas um traço característico no estado de saúde destes indivíduos(25). No entanto, é importante salientar que as bactérias mais ativas da cavidade oral, ou suas enzimas digestivas de forma isolada, podem atuar sinergicamente na reação de clivagem do glúten, o que pode ser promissor no tratamento futuro da doença celíaca(28).

Tian N, *et al*(24) realizaram um estudo cujo objetivo foi comparar as atividades enzimáticas salivares e a microbiota oral em indivíduos saudáveis *versus* doentes celíacos (incluindo a forma refratária). Os autores concluíram que as atividades enzimáticas de degradação do glúten na saliva eram maiores nos doentes celíacos em comparação com grupo controlo, assim como inferiram que os microbiomas orais de doentes celíacos (incluindo os acometidos pela forma refratária) apresentavam diferenças significativas em relação aos indivíduos saudáveis, sendo disso exemplo, os *Lactobacilos*, que podem explicar em parte a maior atividade de degradação de glúten na cavidade oral dos celíacos(24, 25). Tian N, *et al*(24) constataram diferenças entre doentes celíacos e pacientes com doença celíaca refratária, tendo observado 22 espécies, da microbiota oral, com maior representatividade nos doentes celíacos normais (sendo metade das espécies pertencentes ao

Firmicutes phylum) e 5 espécies em maior quantidade nos pacientes com doença celíaca refratária (maior parte pertencente à *Actinobacteria phylum* – estes dados poderão ser usados como biomarcadores salivares para diagnóstico e até avaliar o risco de um doente celíaco vir a desenvolver a forma refratária da doença. Tian N, *et al*(24) sugeriram também que as atividades enzimáticas dos constituintes da microbiota oral podem contribuir para libertação de mais péptidos de glúten imunogénicos, promovendo a ocorrência da doença celíaca.

Bonamico M, *et al*(26) realizaram um estudo em crianças, com idades compreendidas entre os 6 e 8 anos, para demonstrar que o anticorpo tTG IgA (específico da doença celíaca) pode ser encontrado na saliva de doentes celíacos. Os autores constataram, de facto, a presença desse anticorpo específico na saliva de crianças com a doença, com boa sensibilidade e especificidade, e com associação positiva em relação aos dados serológicos. Foi concluído que é possível efetuar uma monitorização simples, eficaz, viável e forte dos doentes celíacos, usando a saliva. Adornetto G, *et al*(32) efeturam um estudo onde também chegaram à conclusão que é possível fazer a monitorização da doença celíaca detendo-se anticorpos anti-tTG em amostras salivares de doentes celíacos.

5.3 Cancros Esofágico, Gástrico e Pancreático

➤ Cancro Esofágico

A identificação de miRNA's no cancro esofágico tem vindo a revelar-se uma área promissora de investigação, uma vez que a libertação de RNA pelas células em apoptose, em quantidades razoáveis, permite identificação precoce e monitorização da evolução da patologia, tornando assim eficiente e plausível a descoberta destes marcadores biológicos em diferentes fluídos do organismo, onde se inclui a saliva(39, 59, 60, 65).

Xie Z, *et al*(7, 37) detetaram incongruências entre os níveis de expressão de 25 miRNA's salivares, ao analisarem o grupo de controlo (saudável) e grupo de indivíduos com cancro esofágico. Na fase de validação, reduziram a 4 os miRNA's que se apresentavam com expressão significativamente aumentada nos indivíduos com cancro esofágico, sendo eles: miR-10b, miR-144 e miR-451, na saliva total; miR-10b, miR-144, miR-451 e miR-21, na saliva sobrenadante. Segundo os autores, os miRNA's miR-10b, miR-144 e miR-451 presentes na saliva total e na saliva sobrenadante apresentaram uma correlação significativa – o que vem sugerir que a capacidade de discriminação dos dois tipos de saliva é bastante similar. Neste estudo, o miR-21 estava com expressão aumentada apenas na saliva sobrenadante dos indivíduos com cancro esofágico, o que pode sugerir que esteja apenas em maior quantidade em circulação nos fluídos corporais, como plasma e saliva(7). Com esta investigação, os autores sugerem que os miRNA's salivares identificados, e em particular o miR-21 da saliva sobrenadante, têm o potencial de se assumirem como biomarcadores do cancro esofágico, auxiliando no diagnóstico precoce do mesmo(7, 37, 60).

O miR-21 está intimamente relacionado com vários cancros, com especial ligação àqueles do trato gastrointestinal. O cancro esofágico não é exceção, podendo-se encontrar no plasma uma quantidade aumentada de mir-21 (assim como nos cancros gástrico, pancreático e colorretal, por exemplo)(7, 59, 60). O miR-21 parece estar envolvido na patogénese, desenvolvimento e metástase do cancro(59).

Chen X, *et al*(42) realizaram um estudo em que associaram a microbiota oral com o risco de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do esófago, algo que poderá ser encarado no âmbito dos marcadores biológicos, mas já numa vertente preventiva e não tanto de diagnóstico(42, 66). Os autores chegaram à conclusão que os indivíduos com carcinoma de células escamosas apresentavam, de uma forma geral, uma redução da diversidade da comunidade bacteriana, quando comparados com o grupo de controlo (saudáveis) e o grupo com displasia. Estes dados vêm ao encontro de evidências que sugerem um papel importante da microbiota residente na

evolução da carcinogénese(42, 67). No entanto, os autores não conseguiram inferir se essa redução se deve ao aparecimento e instalação do carcinoma ou se é algo que causa o carcinoma. Chen X, *et al*(42) chegaram à conclusão que o género *Mycoplasma* (associado a outros tipos de cancro, como o gástrico e do cólon, e resistente aos antibióticos mais comuns) se encontrava mais presente no grupo de indivíduos com carcinoma de células escamosas do esófago. De igual forma, existia uma maior abundância de dos géneros *Prevotella* e *Streptococcus* no referido grupo, quando comparado com os grupos saudável e de displasia(42). Estes dois géneros de bactérias representavam cerca de 65% da microbiota total dos indivíduos com carcinoma – em evidência a baixa diversidade-, e apesar de serem geralmente não patogénicos para o hospedeiro, já foram associados a cancros oral e do trato digestivo superior(42, 66). O microbioma oral pode, então, desempenhar um papel importante no aparecimento de cancro – novo potencial biomarcador salivar(66).

➤ **Cancro Gástrico**

Xiao H, *et al*(48) realizaram um estudo proteómico quantitativo para discriminar e identificar biomarcadores salivares passíveis de serem utilizados para deteção do cancro gástrico. Nesse sentido, analisaram e compararam proteínas salivares entre grupo de indivíduos com cancro gástrico e grupo de controlo (saudável). Foram identificadas 48 proteínas com expressão significativamente diferenciada entre os dois grupos, mas somente 3 dessas foram selecionadas, pois apresentavam capacidade de diferenciar os indivíduos com cancro gástrico do grupo de controlo, nomeadamente: CSTB, TPI1 e DMBT1. As três proteínas mencionadas encontravam-se com baixa expressão nos indivíduos com cancro. Xiao H, *et al*(48) conseguiram demonstrar com estes resultados encorajadores que a saliva tem potencial para ser utilizada para deteção de cancro gástrico, fazendo-se a análise e quantificação destes biomarcadores salivares – a combinação dessas três

proteínas alcançou uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 80% para deteção de cancro gástrico.

Salazar CR, *et al*(46) efetuaram um estudo que visou demonstrar que indivíduos com doença periodontal, com grandes índices de colonização de agentes patogénicos periodontais, têm um risco acrescido de vir a desenvolver lesões gástricas pré-cancerosas. Os autores recolheram amostras de saliva e placa dentária, que foram testadas por PCR quantitativo em tempo real para analisar os níveis de DNA dos agentes patogénicos associados à doença periodontal. Salazar CR, *et al*(46) obtiveram resultados que mostram associação positiva entre as espécies bacterianas selecionadas – *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, presentes na placa – e a presença de lesões gástricas pré-cancerosas, embora estas relações não tenham alcançado a desejada significância estatística. Para tentar contornar este facto, Salazar CR, *et al*(46) procuraram correlacionar diferentes graus de gravidade de doença periodontal com lesões pré-cancerosas. Deste modo, os autores conseguiram observar associação positiva e consistente entre os agentes patogénicos periodontais e lesões gástricas pré-cancerosas, em indivíduos com sintomas mais severos de doença periodontal – com destaque para *A. actinomycetemcomitans* que se encontrava bastante elevada. Sugerindo que níveis superiores de agentes patogénicos periodontais, em indivíduos com maior percentagem de hemorragia pós-sondagem e bolsas periodontais profundas, são indicadores de uma infeção específica a longo termo com efeito mais exuberante na inflamação geral. Foi proposto que a infeção periodontal poderá estar relacionada com o desenvolvimento de cancro gástrico, sendo que as bactérias destacadas poderão ter potencial para serem usadas como biomarcadores preventivos e de análise da probabilidade de ocorrência de cancro.

Wu ZZ, *et al*(47) investigaram novo método para diagnóstico precoce de cancro gástrico, tendo analisado proteínas salivares através de espectrometria de massa e testado as variações de proteoma da saliva entre indivíduos com cancro gástrico e grupo de controlo (saudável). Os autores constataram diferenças entre os indivíduos com cancro e os saudáveis, o que veio reforçar

as suas convicções de que o método que aplicaram seria de interesse para auxílio do diagnóstico precoce do cancro gástrico. As variações resumiram-se a 4 proteínas – 1472.78 Da, 2936.49 Da, 6556.81 Da e 7081.17 Da. Wu ZZ, *et al*(47) observaram que a proteína 1472.78 Da era a que mais se diferenciava entre grupos, estando significativamente elevada nos indivíduos com cancro gástrico. Constataram ainda que apenas a proteína 6556.81 Da se encontrava com menor expressão nos indivíduos com doença, quando comparado com o grupo de controlo.

Maejima R, *et al*(45) realizaram um estudo envolvendo indivíduos com deficiência no gene ALDH2, que aumenta o risco de ocorrência de cancro do trato gastrointestinal (superior) quando associado ao consumo de álcool. Os autores constataram que níveis aumentados de acetaldeído não só foram encontrados na mucosa gástrica, mas também na saliva de indivíduos com deficiência no gene ALDH2. Maejima R, *et al*(45) concluíram que a informação recolhida do seu estudo abre novas perspectivas para prevenção do cancro gástrico, particularmente nos indivíduos com deficiência no gene ALDH2, gastrite atrófica, infeção pela *Helicobacter pylori* e com administração regular de fármacos inibidores da bomba de protões.

➤ **Cancro Pancreático**

Xie Z, *et al*(12) realizaram uma investigação no âmbito do cancro pancreático com possível resseção cirúrgica, com o intuito de identificar miRNA's salivares que pudessem ser usados como biomarcadores para deteção do mesmo. Os autores analisaram o perfil de miRNA'S salivares entre o grupo de controlo (saudável) e pacientes com cancro pancreático passível de resseção. Xie Z, *et al*(12) avaliaram os miRNA's salivares validados dentro de três categorias discriminadas: pacientes com cancro pancreático *versus* grupo controlo; pacientes com cancro pancreático *versus* grupo com tumor pancreático benigno; e pacientes com cancro pancreático *versus* grupo sem cancro (saudável e tumor benigno). Os resultados que Xie Z, *et al*(12) obtiveram foram elucidativos, pois identificaram os miRNA's salivares miR-

3679-5p (com expressão significativamente reduzida no cancro pancreático) e miR-940 (com expressão significativamente aumentada no cancro pancreático)(11) como potenciais biomarcadores discriminatórios e diferenciadores do cancro pancreático em relação aos grupos não portadores de cancro. A sensibilidade e especificidade dos resultados rondaram os 60-80%, números superiores àqueles que caracterizam o biomarcador (sanguíneo) mais utilizado para deteção do cancro pancreático, CA19-9(11, 12, 54-56). A combinação do miR-3679-5p com miR-940 aumenta o poder discriminatório de deteção do cancro pancreático. Ambos os miRNA's demonstraram capacidade para diferenciar tumor pancreático benigno do cancro, com relativa sensibilidade e especificidade(12). Futuros estudos prospetivos são necessários para melhores esclarecimentos, porém este estudo revelou-se viável, dando boas indicações no sentido de auxílio do diagnóstico precoce do cancro pancreático.

Humeau M, *et al*(6) testaram mais de 90 microRNA's, tendo identificado 3 principais que se encontravam significativamente desregulados na saliva de indivíduos com cancro pancreático, em comparação com o grupo de controlo – hsa-miR-21, hsa-miR-23a e hsa-miR-23b(11). Os autores constataram que esses três mRNA's se encontravam estritamente na saliva dos pacientes com cancro, com uma grande sensibilidade associada. Humeau M, *et al*(6) chegaram à conclusão que hsa-miR-21, hsa-miR-23a e hsa-miR-23b estão também presentes na saliva de pacientes com pancreatite, o que pode ser explicado pelo facto de esta ser uma lesão precursora bem caracterizada do cancro pancreático. Por outro lado, caso estes três miRNA's estejam com expressão elevada em doentes com pancreatite, o risco de virem a desenvolver cancro pancreático parece ser elevado. Humeau M, *et al*(6) reclamam com o seu estudo a importância destes três miRNA's, como biomarcadores salivares, para a deteção precoce do cancro pancreático. Os autores deram especial destaque ao hsa-mir-21, sobejamente referenciado na literatura oncológica, onde se inclui o cancro pancreático(68). O hsa-miR-21 surge maioritariamente com grande expressão no cancro pancreático, sendo um indicativo de mau prognóstico, má resposta ao tratamento e/ou indicador de metástases(6, 68).

Xie Z, *et al*(54) conduziram um estudo com o intuito de identificar lncRNA's salivares que pudessem ser usados como marcadores biológicos para diagnóstico do cancro pancreático. Os autores direcionaram o seu estudo partindo de 5 lncRNA's que têm vindo a ser associados com cancro pancreático – H19, HOTAIR, HOTTIP, MALAT1 e PVT1. Xie Z, *et al*(54) mediram a expressão desses 5 lncRNA's recorrendo à reação de polimerização em cadeia quantitativa (qPCR). Após essa análise, os autores concluíram que HOTAIR e PVT1, com expressão significativamente aumentada nos indivíduos com cancro pancreático, são os lncRNA's que demonstram maior potencial para constituírem biomarcadores salivares para deteção do cancro pancreático – HOTAIR e PVT1 salivares possuem bom poder discriminatório entre indivíduos saudáveis e pacientes com tumor pancreático benigno, com especificidade e sensibilidade a variarem entre os 60-100%. Xie Z, *et al*(54) concluíram ainda que após pancreatectomia, sem recidiva durante 6 meses, os níveis de expressão de HOTAIR e PVT1 nos pacientes com cancro sofreram uma redução significativa. Já os níveis salivares dos dois referidos lncRNA's não apresentavam diferenças significativas entre indivíduos com tumor benigno e os saudáveis, sugerindo que apenas ocorre aumento de expressão ao se desenvolver o cancro pancreático.

Machida T, *et al*(11) realizaram um estudo com o intuito de identificar miRNA's em exossomas salivares que pudessem ser usados como biomarcadores para diagnóstico de cancro do pâncreas. Partindo do pressuposto que o perfil de expressão de miRNA's na saliva é similar ao do plasma, debruçaram-se em quatro miRNA's – miR-1246, miR-3976, miR-4306 e miR-4644. Os autores avaliaram a expressão dos miRNA's e chegaram à conclusão que o miR-1246 e miR-4644 se apresentavam em níveis significativamente superiores no grupo de indivíduos com cancro do pâncreas – miRNA's com potencial para serem biomarcadores discriminatórios. Machida T, *et al*(11) alcançaram sensibilidade e especificidade para deteção de cancro pancreático, utilizando esses exossomas salivares, de 66,7% e 100% para o miR-1246 e de 75% e 76,9% para miR-4644, respetivamente. A combinação dos dois miRNA's nos exossomas salivares aumentou a sensibilidade para o

diagnóstico de cancro pancreático. Os autores concluíram ainda que que o miR-1246 salivar parece estar associado com marcadores plasmáticos do cancro do pâncreas, nomeadamente com o CA19-9.

Zhang L, *et al*(55) desenvolveram um estudo com o objetivo de identificar biomarcadores salivares com potencial para detetar cancro pancreático, fazendo uso de saliva sobrenadante. Os autores, partindo de 12 mRNA's reduziram-nos a uma combinação de 4 mRNA's(56) com potencial para serem biomarcadores salivares capazes de diferenciar os pacientes com cancro pancreático do grupo de indivíduos sem cancro (saudáveis e com pancreatite crónica) – KRAS, MDB3L2, ACRV1 e DPM1. Zhang L, *et al*(55) conseguiram obter uma sensibilidade de 90% e especificidade de 95% com a combinação dos 4 mRNA's referidos, estes biomarcadores salivares associados possuem um considerável poder discriminatório para diferenciar entre pacientes com cancro do pâncreas e indivíduos não acometidos por cancro(55, 56). O KRAS assume particular interesse, pois trata-se um marcador biológico presente na saliva e que normalmente é um alvo molecular mutado no cancro pancreático(55).

Farrel J, *et al*(57) realizaram um estudo em que observaram uma associação entre a variação da microbiota salivar de pacientes com cancro pancreático e de indivíduos do grupo de controlo (saudáveis e com pancreatite crónica). Os autores concluíram com 96,4% de sensibilidade e 82,1% de especificidade, que a combinação de dois biomarcadores bacterianos – *N. elongata* e *S. mitis* – tinham a capacidade de distinguir entre pacientes com cancro pancreático e pacientes saudáveis, apresentando-se com níveis significativamente baixos nos pacientes com cancro. Farrel J, *et al*(57) referem no seu estudo que os lipopolissacarídeos presentes nas bactérias podem alterar a atividade das células imunológicas e, ainda, atuar em determinadas células epiteliais, onde se incluem as células cancerígenas, promovendo a transformação fenotípica das mesmas. Todos estes fatores podem explicar a possível ligação entre inflamação persistente e desenvolvimento e progressão do cancro.

6 Conclusão

No presente trabalho foram apresentadas e exploradas algumas das patologias mais frequentes do trato gastrointestinal, a nível global. Patologias essas com diferentes etiopatogenias e grau de gravidade das perturbações e desordens causadas ao estado de saúde e qualidade de vida dos doentes – doenças com génese inflamatória (autoimune) ou neoplásica. Atualmente, urge a necessidade da deteção precoce das demais patologias, com o intuito de assegurar um melhor prognóstico e uma eliminação/controlo mais eficaz e efetivo da doença com o menor índice de comprometimento da qualidade de vida dos doentes – a saliva surge, então, como um promissor fluido corporal que pode ser utilizado pelos profissionais de saúde para o diagnóstico precoce de determinadas enfermidades, através de marcadores biológicos presentes na sua composição(1).

Os diferentes investigadores consultados reúnem consenso ao referirem que mais estudos são essenciais e imprescindíveis para que biomarcadores salivares possam ser usados como ferramentas de diagnóstico inequívocas de patologias do trato gastrointestinal, porém ressalvam o seu grande potencial na deteção precoce, monitorização e indicação terapêutica de doenças sistémicas(3, 60). É também verdade que a saliva parece fornecer menos informação que os meios auxiliares de diagnóstico convencionais (análises sanguíneas, por exemplo), atendendo aos desenvolvimentos até à presente data(39). No entanto, é indubitável a relevância que tem e terá enquanto recurso para identificação de biomarcadores de diversas patologias sistémicas, assumindo um papel relevante para o auxílio do diagnóstico precoce e, por conseguinte, melhorando o prognóstico, com claro destaque para as que foram enumeradas e exploradas na presente dissertação(14, 39).

7 Referências Bibliográficas

1. Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, Fanali C, Fiorita A, Cabras T, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. 2011;31(6):347-57.
2. Lima DP, Correia ASC, Anjos ALD, Boer NP. Use of Saliva for Diagnosis of Oral and Systemic Diseases. *Revista Odontológica de Araçatuba*. 2014;35:5.
3. Farina A. Proximal fluid proteomics for the discovery of digestive cancer biomarkers. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1844(5):988-1002.
4. Rathnayake N, Åkerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases. *PLoS ONE*. 2013;8(4).
5. Xiao H, Zhang Y, Kim Y, Kim S, Kim JJ, Kim KM, et al. Differential Proteomic Analysis of Human Saliva using Tandem Mass Tags Quantification for Gastric Cancer Detection. *Scientific Reports*. 2016;6:22165.
6. Humeau M, Vignolle-Vidoni A, Sicard F, Martins F, Bournet B, Buscail L, et al. Salivary MicroRNA in Pancreatic Cancer Patients. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0130996.
7. Xie Z, Chen G, Zhang X, Li D, Huang J, Yang C, et al. Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer. *PloS one*. 2013;8(4):e57502.
8. Schaefer JS, Attumi T, Opekun AR, Abraham B, Hou J, Shelby H, et al. MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC immunology*. 2015;16:5.
9. Adornetto G, Fabiani L, Volpe G, De Stefano A, Martini S, Nenna R, et al. An electrochemical immunoassay for the screening of celiac disease in saliva samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407(23):7189-96.
10. Mina S, Azcurra AI, Riga C, Cornejo LS, Brunotto M. Evaluation of clinical dental variables to build classifiers to predict celiac disease. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2008;13(7):E398-402.
11. Machida T, Tomofuji T, Maruyama T, Yoneda T, Ekuni D, Azuma T, et al. miR1246 and miR4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. *Oncology reports*. 2016;36(4):2375-81.
12. Xie Z, Yin X, Gong B, Nie W, Wu B, Zhang X, et al. Salivary microRNAs show potential as a noninvasive biomarker for detecting resectable pancreatic cancer. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2015;8(2):165-73.
13. Zheng X, Chen F, Zhang Q, Liu Y, You P, Sun S, et al. Salivary exosomal PSMA7: a promising biomarker of inflammatory bowel disease. *Protein & cell*. 2017;8(9):686-95.
14. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. *PloS one*. 2013;8(4):e61356.
15. Szczeklik K, Krzysciak W, Domagala-Rodacka R, Mach P, Darczuk D, Cibor D, et al. Alterations in glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in plasma and saliva in relation to disease activity in patients with Crohn's disease. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2016;67(5):709-15.
16. Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, et al. Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 2014;21(1):15-25.
17. Nakagome S, Chinen H, Iraha A, Hokama A, Takeyama Y, Sakisaka S, et al. Confounding effects of microbiome on the susceptibility of TNFSF15 to Crohn's disease in the Ryukyu Islands. *Human genetics*. 2017;136(4):387-97.

18. McGovern DP, Jones MR, Taylor KD, Marcianti K, Yan X, Dubinsky M, et al. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Human molecular genetics*. 2010;19(17):3468-76.
19. Hong J, Leung E, Fraser A, Krissansen GW. Nucleic acid from saliva and salivary cells for noninvasive genotyping of Crohn's disease patients. *Genetic testing*. 2008;12(4):587-9.
20. Szczeklik K, Owczarek D, Pytko-Polonczyk J, Kesek B, Mach TH. Proinflammatory cytokines in the saliva of patients with active and non-active Crohn's disease. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2012;122(5):200-8.
21. Hagel AF, de Rossi T, Konturek PC, Albrecht H, Walker S, Hahn EG, et al. Plasma histamine and tumour necrosis factor-alpha levels in Crohn's disease and ulcerative colitis at various stages of disease. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2015;66(4):549-56.
22. Alzoghaibi MA. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(39):6540-7.
23. Pizarro G, Quera R, Figueroa C. [Prognostic factors of ulcerative colitis at the moment of diagnosis]. *Revista medica de Chile*. 2017;145(10):1319-29.
24. Tian N, Faller L, Leffler DA, Kelly CP, Hansen J, Bosch JA, et al. Salivary Gluten Degradation and Oral Microbial Profiles in Healthy Individuals and Celiac Disease Patients. *Applied and environmental microbiology*. 2017;83(6).
25. De Angelis M, Vannini L, Di Cagno R, Cavallo N, Minervini F, Francavilla R, et al. Salivary and fecal microbiota and metabolome of celiac children under gluten-free diet. *International journal of food microbiology*. 2016;239:125-32.
26. Bonamico M, Nenna R, Montuori M, Luparia RP, Turchetti A, Mennini M, et al. First salivary screening of celiac disease by detection of anti-transglutaminase autoantibody radioimmunoassay in 5000 Italian primary schoolchildren. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2011;52(1):17-20.
27. Tian N, Leffler DA, Kelly CP, Hansen J, Marietta EV, Murray JA, et al. Despite sequence homologies to gluten, salivary proline-rich proteins do not elicit immune responses central to the pathogenesis of celiac disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015;309(11):G910-7.
28. Fernandez-Feo M, Wei G, Blumenkranz G, Dewhirst FE, Schuppan D, Oppenheim FG, et al. The cultivable human oral gluten-degrading microbiome and its potential implications in coeliac disease and gluten sensitivity. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(9):E386-94.
29. de Carvalho FK, de Queiroz AM, Bezerra da Silva RA, Sawamura R, Bachmann L, Bezerra da Silva LA, et al. Oral aspects in celiac disease children: clinical and dental enamel chemical evaluation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2015;119(6):636-43.
30. Mukherjee R, Kelly CP, Leffler DA. Gastrointestinal cancer in celiac disease: "the first days are the hardest days, don't you worry anymore?". *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2012;10(1):4-6.
31. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013;62(1):43-52.
32. Adornetto G, Fabiani L, Volpe G, De Stefano A, Martini S, Nenna R, et al. An electrochemical immunoassay for the screening of celiac disease in saliva samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015;407(23):7189-96.
33. Sollid LM, Khosla C. Novel Therapies for Coeliac Disease. *Journal of internal medicine*. 2011;269(6):604-13.

34. Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. *Gut Microbes*. 2010;1(3):135-7.
35. Plugis NM, Khosla C. Therapeutic approaches for celiac disease. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2015;29(3):503-21.
36. Malamut G, Cellier C. Refractory celiac disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2014;8(3):323-8.
37. Xie ZJ, Chen G, Zhang XC, Li DF, Huang J, Li ZJ. Saliva supernatant miR-21: a novel potential biomarker for esophageal cancer detection. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(12):6145-9.
38. Kim T, Grobmyer SR, Smith R, Ben-David K, Ang D, Vogel SB, et al. Esophageal cancer--the five year survivors. *Journal of surgical oncology*. 2011;103(2):179-83.
39. Gonzalez-Plaza JJ, Hulak N, Garcia-Fuentes E, Garrido-Sanchez L, Zhumadilov Z, Akilzhanova A. Oesophageal squamous cell carcinoma (ESCC): Advances through omics technologies, towards ESCC salivaomics. *Drug discoveries & therapeutics*. 2015;9(4):247-57.
40. Zhang X, Lin P, Zhu ZH, Long H, Wen J, Yang H, et al. Expression profiles of early esophageal squamous cell carcinoma by cDNA microarray. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2009;194(1):23-9.
41. Barber TW, Duong CP, Leong T, Bressel M, Drummond EG, Hicks RJ. 18F-FDG PET/CT has a high impact on patient management and provides powerful prognostic stratification in the primary staging of esophageal cancer: a prospective study with mature survival data. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2012;53(6):864-71.
42. Chen X, Winckler B, Lu M, Cheng H, Yuan Z, Yang Y, et al. Oral Microbiota and Risk for Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a High-Risk Area of China. *PloS one*. 2015;10(12):e0143603.
43. Hu JM, Li L, Chen YZ, Pang LJ, Yang L, Liu CX, et al. Human papillomavirus type 16 infection may be involved in esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis in Chinese Kazakh patients. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*. 2013;26(7):703-7.
44. Sepehr A, Kamangar F, Fahimi S, Saidi F, Abnet CC, Dawsey SM. Poor oral health as a risk factor for esophageal squamous dysplasia in northeastern Iran. *Anticancer research*. 2005;25(1b):543-6.
45. Maejima R, Iijima K, Kaihovaara P, Hatta W, Koike T, Imatani A, et al. Effects of ALDH2 genotype, PPI treatment and L-cysteine on carcinogenic acetaldehyde in gastric juice and saliva after intragastric alcohol administration. *PloS one*. 2015;10(4):e0120397.
46. Salazar CR, Sun J, Li Y, Francois F, Corby P, Perez-Perez G, et al. Association between selected oral pathogens and gastric precancerous lesions. *PloS one*. 2013;8(1):e51604.
47. Wu ZZ, Wang JG, Zhang XL. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(7):865-70.
48. Xiao H, Zhang Y, Kim Y, Kim S, Kim JJ, Kim KM, et al. Differential Proteomic Analysis of Human Saliva using Tandem Mass Tags Quantification for Gastric Cancer Detection. *Scientific reports*. 2016;6:22165.
49. Momtaz H, Souod N, Dabiri H, Sarshar M. Study of Helicobacter pylori genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(17):2105-11.
50. Yao Y, Xu M, Liang L, Zhang H, Xu R, Feng Q, et al. Genome-wide analysis of Epstein-Barr virus identifies variants and genes associated with gastric carcinoma and population structure. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017;39(10):1010428317714195.

51. Palser AL, Grayson NE, White RE, Corton C, Correia S, Ba abdullah MM, et al. Genome Diversity of Epstein-Barr Virus from Multiple Tumor Types and Normal Infection. *Journal of Virology*. 2015;89(10):5222-37.
52. Seitz HK, Stickel F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes & Nutrition*. 2010;5(2):121-8.
53. Yang S, Lee J, Choi IJ, Kim YW, Ryu KW, Sung J, et al. Effects of alcohol consumption, ALDH2 rs671 polymorphism, and Helicobacter pylori infection on the gastric cancer risk in a Korean population. *Oncotarget*. 2017;8(4):6630-41.
54. Xie Z, Chen X, Li J, Guo Y, Li H, Pan X, et al. Salivary HOTAIR and PVT1 as novel biomarkers for early pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016;7(18):25408-19.
55. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(3):949-57.e1-7.
56. Hamada S, Shimosegawa T. Biomarkers of pancreatic cancer. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al]. 2011;11 Suppl 2:14-9.
57. Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, Chia D, Elashoff D, Akin D, et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*. 2012;61(4):582-8.
58. Arumugam T, Logsdon CD. S100P: a novel therapeutic target for cancer. *Amino acids*. 2011;41(4):893-9.
59. Wan J, Wu W, Che Y, Kang N, Zhang R. Insights into the potential use of microRNAs as a novel class of biomarkers in esophageal cancer. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*. 2016;29(5):412-20.
60. Wang Y, Wang Q, Zhang N, Ma H, Gu Y, Tang H, et al. Identification of microRNAs as novel biomarkers for detecting esophageal squamous cell carcinoma in Asians: a meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(11):11595-604.
61. Sazanov AA, Kiselyova EV, Zakharenko AA, Romanov MN, Zaraysky MI. Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients. *Journal of applied genetics*. 2017;58(2):231-7.
62. Nedaeinia R, Manian M, Jazayeri MH, Ranjbar M, Salehi R, Sharifi M, et al. Circulating exosomes and exosomal microRNAs as biomarkers in gastrointestinal cancer. *Cancer gene therapy*. 2017;24(2):48-56.
63. Shi T, Gao G, Cao Y. Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics. *Disease markers*. 2016;2016:9085195.
64. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*. 2008;18:997.
65. Liao J, Liu R, Yin L, Pu Y. Expression Profiling of Exosomal miRNAs Derived from Human Esophageal Cancer Cells by Solexa High-Throughput Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(9):15530-51.
66. Ahn J, Chen CY, Hayes RB. Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. *Cancer causes & control : CCC*. 2012;23(3):399-404.
67. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(11):800-12.
68. Humeau M, Torrisani J, Cordelier P. miRNA in clinical practice: pancreatic cancer. *Clinical biochemistry*. 2013;46(10-11):933-6.

8 Anexos

- I. Declaração de Autoria do Trabalho Apresentado
- II. Parecer do Orientador

ANEXO I



Declaração

Monografia de Investigação/ Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, integrado no Mestrado Integrado em Medicina Dentária, da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 17 de Maio de 2018

(O autor)

ANEXO II

U. PORTO

 FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Parecer do Orientador

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pelo estudante Miguel Alcino Ramos Faria Coelho, com o título: "Saliva como Ferramenta de Diagnóstico de Patologias do Trato Gastrointestinal", está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 17 de maio de 2018

O orientador



(Professor João Miguel Silva e Costa Rodrigues)